

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOĻĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOĻĢIJAS UN BIOĶĪMIJAS KATEDRA

JAUNAS PIEEJAS IZSTRĀDĀŠANA AUDZĒJU
ANTIGĒNU MIKROČIPU IZGATAVOŠANAI

DEVELOPMENT OF NOVEL APPROACH FOR THE
PRODUCTION OF TUMOR ANTIGEN MICROARRAYS

Bakalaura darbs

Autors: Edgars Endzeliņš
Stud. apl. Nr. ee06006
Darba vadītājs: Dr. biol. Aija Linē
Katedras vadītājs: Prof., Dr. biol. Viesturs Baumanis
Recenzents: Dr. biol. Normunds Līcis

RĪGA 2009

SATURS

KOPSAVILKUMS	4
SUMMARY	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1 Karcinogēnēze un ļaundabīgo audzēju raksturīpašības	7
1.2. Ļaundabīgo audzēju imunoloģija	13
1.3. Ļaundabīgo audzēju antigēnu identificēšana	16
1.4 Fāgu displeja sistēmas	20
1.5 Proteīnu mikročipu tehnoloģija	22
2. MATERIĀLI UN METODEDES	24
2.1. Materiāli	24
2.1.1 Reaktīvi un izejvielas	24
2.1.2 Reaģentu un izejvielu komplekti	24
2.1.3 Sintētiskie oligonukleotīdi	25
2.1.4 Bufēršķīdumi	25
2.1.5. Barotnes	26
2.1.6. Baktēriju celmi un vektori	26
2.1.7. Serumi	27
2.1.8. Aparatūra un aprīkojums	27
2.2. Metodes	28
2.2.1. 3C saita oligonukleotīdu hibridizēšana	28
2.2.2. T7-SIIT1 vektora dubulta šķelšana pa <i>Bam</i> HI un <i>Eco</i> RI restrikcijas saitēm	28
2.2.3. 3C proteāzes saita liģēšana T7-SIIT1 vektorā	29
2.2.4. Rekombinanto T7 fāgu pakošana	29
2.2.5. Rekombinanto fāgu titrēšana	29
2.2.6. Fāgu izolēšana	30
2.2.7. T7 polilinkera rajona PCR amplificēšana	31
2.2.8. DNS elektroforēze agarozes gēlā	31
2.2.9. T7 polilinkera rajona DNS krāsas-terminatora sekvenēšana	32
2.2.10. Fāgu amplificēšana	34
2.2.11. Fāgu DNS izdalīšana	34
2.2.12. T7-SIIT1-3C vektora DNS šķelšana pa <i>Hind</i> III un <i>Sal</i> I / <i>Eco</i> RI restrikcijas saitēm	35
2.2.13. Audzēja antigēnu DNS PCR amplificēšana	36
2.2.14. PCR produktu DNS paš-liģēšana	37
2.2.15. Liģēto PCR produktu šķelšana pa <i>Hind</i> III un <i>Sal</i> I / <i>Eco</i> RI restrikcijas saitēm	37
2.2.16. Antigēnu insertu liģēšana T7-SIIT1-3C vektorā	37
2.2.17. Audzēju antigēnus nesošo T7-SIIT1-3C vektoru amplificēšana	38
2.2.18. Antigēnu atšķelšana ar 3C proteāzi no T7-SIIT1-3C vektoru apvalka 10B proteīna	38
2.2.19. Proteīnu imunoblots	38
2.2.20. Antigēnu mikročipu izgatavošana un testēšana	40
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	42
3.1. HRV 3C proteāzes šķelšanas saita sekvenci saturošu T7 fāga displeja vektoru konstruēšana	43
3.2. Audzēja asociēto antigēnu klonēšana T7-SIIT1-3C vektorā	44
3.3. Audzēju asociēto antigēnu atšķelšana no rekombinanto fāgu daļiņu virsmas un proteīnu imunoblota analīzes	44
3.4. Antigēnu mikročipu izgatavošana un testēšana	47
4. SECINĀJUMI	50
5. PATEICĪBAS	51

6. LITERATŪRAS SARAKSTS	52
Monogrāfijas.....	52
Raksti žurnālos	52
Interneta vietnes.....	58

KOPSAVILKUMS

Ļaundabīgo audzēju antigēnu mikročipu tehnoloģija paver jaunas iespējas izstrādāt uz autoantiviēlu noteikšanu balstītus neinvazīvus vēža skrīninga un/vai diagnostikas testus. Līdz šim mūsu laboratorijā projekta "Seroloģiska ļaundabīgo audzēju diagnostikas testa izstrādāšana" ietvaros tika izstrādāti un testēti T7 fāgu displeja audzēju antigēnu mikročipi, kuru galvenos trūkumus raksturo tas, ka rekombinanto proteīnu skaits T7 fāga kapsīdā ir ļoti variabls, kā arī T7 fāga proteīnu klātbūtne var dot viltus pozitīvus signālus, ja testējamais serums satur augsta titra antiviēlas pret T7 fāgu vai *E. coli* antigēniem. Bakalaura darba mērķis bija izstrādāt jaunu pieeju antigēnu mikročipu konstruēšanā, kas ļautu uz čipa printēt no T7 displeja vektora nošķeltus tīrus antigēnus ar Strep-II-Tag iezīmi C galā, kam vajadzētu padarīt šos antigēnus viegli attīrāmus un kvantitējamus.

Bakalaura darba ietvaros uz Strep-II-Tag iezīmi saturoša T7 vektora bāzes tika konstruēts T7 displeja vektors ar 3C proteāzes šķelšanas saita insertu. Šajā vektorā klonējot 12 dažādu audzēju antigēnu kDNS fragmentus, tika izveidots rekombināto fāgu panelis, kas tālāk tika izmantots gan rekombināto proteīnu šķelšanas metodikas izstrādāšanai, gan rekombināto fāgu – antigēnu mikročipu izgatavošanai. Imunoblota un mikročipu analīzes parādīja, ka fāgi uz savas virsmas ekspresē attiecīgos audzēju antigēnus ar Strep-II-Tag iezīmi, 3C proteāze ar augstu efektivitāti atšķel rekombinātos proteīnus, tomēr atšķeltie antigēni nebija detektējami ar StrepMAB antiviēlām pret C gala Strep-II-Tag iezīmi. Mikročipu testi liecināja, ka 3C proteāze degradē vai modificē Strep-II-Tag iezīmi, kā rezultātā antigēni nevar tikt attīrīti ar Strep-Taktīna kolonnu vai atpazīti ar antiviēlām pret Strep-II-Tag.

Bakalaura darbs tika izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā vēža molekulārās ģenētikas darba grupā, grupas vadītājas Dr. biol. Aijas Linē vadībā laikā no 2008. līdz 2009. gadam, 5. un 6. studiju semestrī.

Atslēgvārdi: 3C proteāze, audzēju antigēni, ļaundabīgie audzēji, proteīnu mikročipi, T7 vektors

SUMMARY

Antigen microarray technology opens up new opportunities for the development of non-invasive tests for the diagnosis and/or screening of cancer. Up to now within the framework of project „Development of the novel, non-invasive diagnostic test for the early detection of cancer” T7 phage-displayed tumor antigen microarrays were developed and tested. Major disadvantages of such microarrays are highly variable copy number of recombinant proteins in T7 capsid as well as false positive signals resulting from high-titre antibodies against T7 phage and *E. coli* antigens present in human sera. The objective of this bachelor's paper was to develop a novel approach for the construction of antigen microarrays that would allow cleaving the recombinant Strep-II-Tagged proteins from the surface of the phage and using the purified proteins for the production of antigen microarrays.

Within the framework of bachelor's paper 3C protease's cleavage site containing T7 display vector was constructed on the basis of the previously created Strep-II-Tag containing T7 display vector. cDNA fragments of 12 known tumour antigens were cloned in the obtained vector and the panel of the recombinant phages was used for the elaboration of the cleavage methodology and for the production of phage displayed antigen microarrays. Western blot and microarray analysis demonstrated that the phages display the respective Strep-II-Tagged proteins on their surface, the recombinant proteins can be cleaved off by 3C protease with high efficiency, however the cleaved antigens were undetectable by StrepMAB antibodies against C-terminal Strep-II-Tag label. Tests with microarrays indicated that 3C protease is capable of modifying or degrading Strep-II-Tag label that do not allow purification of antigens by using Strep-Tactin column or the detection with antibodies against Strep-II-Tag.

The bachelor's paper was done in the Latvian Biomedical Research and Study Center, in the Laboratory of Molecular Genetics of Cancer under the supervision of Dr. biol. Aija Linē during the 2008 and 2009 year, during the 5th and 6th semester.

Keywords: 3C protease, cancer, protein microarrays, T7 phage vector, tumor antigens

IEVADS

Vēzis, viens no mūsdienās izplatītākajiem nāves cēloņiem, ir plaša slimību grupa, kuru galvenā pazīme ir nekontrolēta šūnu augšana. Vēzis attīstās transformējoties normālām cilmes šūnām vai mātšūnām karcinoģenēzes procesā, kas ietver plašas pārmaiņas šūnas bioķīmiskajos ceļos. Šādas izmaiņas bieži ir saistītas ar normāliem audiem netipisku proteīnu ekspresiju, kas kalpo par antigēniem, nodrošinot specifisko imūno atbildi. Šādu antigēnu sistemātiskai meklēšanai un identificēšanai ir liela nozīme jaunu ļaundabīgo audzēju diagnostikas un terapijas metožu izstrādē.

Bakalaura darbs tika izstrādāts Valsts pētījumu programmas "Jaunas zāles un biokorekcijas līdzekļi: konstruēšana, transportformas un darbības mehānisms" projekta Nr. 9 "Ļaundabīgo audzēju seroloģiska diagnostikas testa izstrādāšana" ietvaros, kura galvenie mērķi ir:

- Identificēt reprezentatīvu skaitu melanomas un kuņģa vēža antigēnu;
- Izgatavot antigēnu čipu un ar tā palīdzību salīdzināt autoantivielu repertuāru audzēju, iekaisuma un autoimūno slimību pacientu un veselu cilvēku serumā;
- Nosakot šo testu jutību un specifiskumu, izvērtēt iespējas pielietot autoantivielu noteikšanu vēža diagnostikā un/vai skrīningā.

Līdz šim projekta ietvaros tika konstruēti fāgu displeja antigēnu mikročipi, kuru galvenie trūkumi ir sekojoši:

- Rekombinanto T7 fāga kapsīdas proteīnu īpatsvars stipri variē atkarībā no eksponētā proteīna garuma, konformācijas un bioķīmiskajām īpašībām, kā rezultātā uz čipa iespējami viltus negatīvi signāli;
- Iespējami viltus pozitīvi signālus gadījumā, ja testējamais serums nav pietiekami labi preabsorbēts ar fāgu lizātu.

Bakalaura darba mērķis bija izstrādāt jaunu pieeju antigēnu mikročipu konstruēšanā, kas ļautu uz čipa printēt no T7 displeja vektora nošķeltus tīrus antigēnus ar Strep-II-Tag iezīmi C galā, kam vajadzētu padarīt šos antigēnus viegli attīrāmus un kvantitējamus. Turklāt šāda pieeja samazinātu viltus pozitīvu signālu risku.

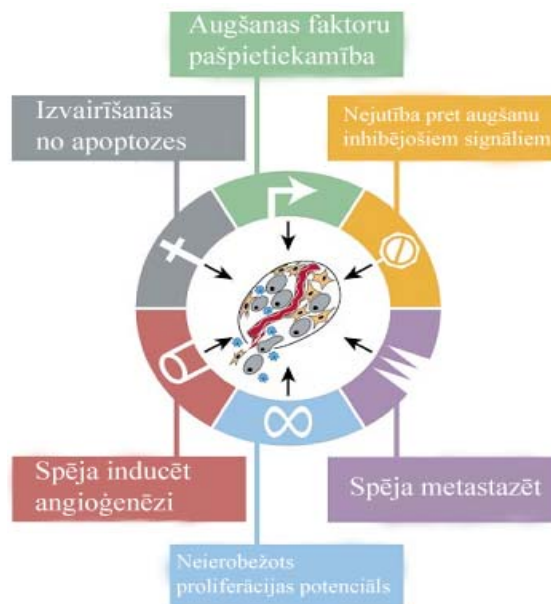
Bakalaura darba uzdevumi:

- Konstruēt T7 displeja vektoru ar HRV 3C proteāzes šķelšanas saitu kodējošas sekvences insertu;
- Ieklonēt šajā vektorā 12 audzēja asociēto antigēnu sekvences;
- Atšķelt antigēnus no T7 displeja vektoriem;
- Izveidot antigēnu mikročipu.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1 Karcinoģenēze un ļaundabīgo audzēju raksturīpašības

Vēzis ir vairāk kā 100 dažādu slimību grupa, kuru galvenā kopīgā pazīme ir nekontrolēta šūnu augšana. Vēzis attīstās, transformējoties normālām organisma šūnām procesā, ko sauc par karcinoģenēzi (Cooper 1993). Karcinoģenēzi var inducēt gan ārēji (ķīmiskas vielas, jonizējoša radiācija, vīrusi), gan iekšēji (hormoni, imūnsistēmas stāvoklis, iedzimtas mutācijas) faktori. Šo faktoru kombinētas vai secīgas iedarbības rezultātā var tikt sekmēta vai ierosināta vēža formēšanās (ACS 2005). Karcinoģenēze ir komplicēts daudzpakāpju process, kas ietver ģenētisku un epigēnētisku izmaiņu akumulēšanos, kas ir priekšnosacījums tādām pārmaiņām šūnas bioķīmiskajos ceļos, kas izsauc sekojošas vēža šūnām raksturīgas pazīmes (1.attēls) (Hanahan et al. 2000):



1.attēls. Ļaundabīgo audzēju īpašības (Hanahan et al. 2000).

Figure 1. The hallmarks of cancer.

1. Neierobežots proliferācijas potenciāls

Replicējoties lineārām hromosomām, notiek hromosomu saīsināšanās, jo, degradējoties praimerim no atpaliekošās ķēdes 5' gala, DNS polimerāze 5' galā vairs nespēj pievienot jaunus nukleotīdus, jo nav vietas jaunam praimerim. Hromosomu no šādas degradācijas pasargā TTAGGG (cilvēkam¹) heksanukleotīdu atkārtojumi hromosomu galos jeb telomēras, kuru garums nosaka šūnas proliferācijas potenciālu, kas normālām cilvēka šūnām nodrošina spēju dalīties aptuveni 50 reizes (Haiflika robeža) (Perkel 2002). Daļai cilmes šūnu eksistē enzīms telomerāze, kas spēj pagarināt telomēras, nodrošinot šīm šūnām neierobežotu proliferācijas potenciālu. Paaugstināta telomerāzes ekspresija raksturīga gandrīz visām vēža šūnām (Shay et al. 2001), tomēr daļa vēža šūnu izmanto alternatīvo telomēru pagarināšanas mehānismu (ALT, alternative lengthening of telomeres), kas balstās uz telomēru apmaiņu starp māshromatīdām (Bryan et al. 1995).

¹ Citiem eikariotiem šī sekvenca var atšķirties

2. Izvairīšanās no apoptozes

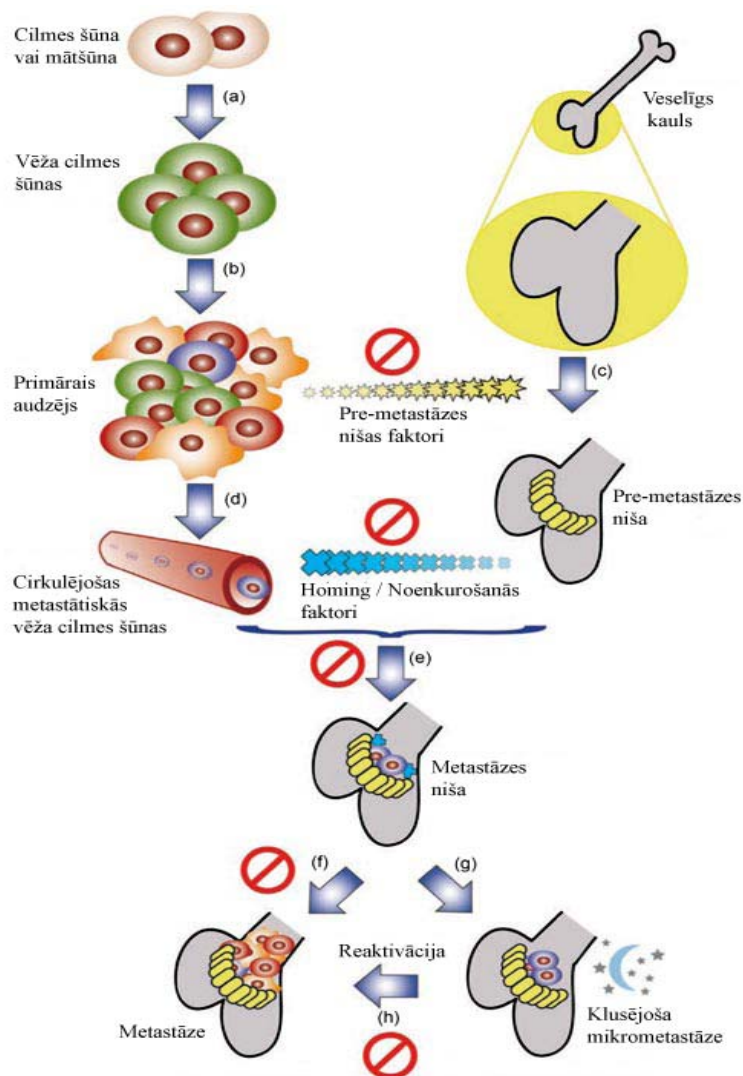
Apoptoze ir viens no galvenajiem programmētās šūnu nāves veidiem, kas tiek palaists ārēju vai iekššūnas signālu ietekmē un ir raksturīgs praktiski visām normālām šūnām. Vēža šūnas ir nejutīgas pret apoptozi izsaukošiem faktoriem. Šādu nejutību pret apoptotiskiem signāliem vai apoptotisko signālu trūkumu var izsaukt dažādi mehānismi, piemēram:

- **Paaugstināta XIAP ekspresija** (raksturīga plaušu vēzim). XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) ir kaspāzes 3, kaspāzes 7 un kaspāzes 9 inhibītors. Kaspāzes aktivē mitohondriju citohroms C, izkļūstot citosolā, kā rezultātā tiek palaists iekšējais apoptozes ceļš. Kaspāze 9 iesaistīta arī ārējā apoptozes ceļā. Šāda kaspāžu inaktivācija noved pie apoptotisko ceļu disfunkcijas (Yang et al. 2003).
- **Traucējumi p53 ceļā.** p53 ir audzējsupresorproteīns, kas uzkrājas DNS bojājumu gadījumā un apstādina šūnas ciklu G1 stadijā, dodot šūnai laiku DNS reparācijai, tomēr, ja bojājumi ir pārāk plaši vai reparācija nav sekmīga, p53 inducē apoptozi, stimulējot Bcl2 asociētā X proteīna (BAX) veidošanos, kurš inducē citohroma c izdali citoplazmā. p53 gēna transkripciju izsauc interferoni α un β . Mutācijas p53 vai interferonu gēnos izsauc apoptozes traucējumus DNS bojājumu gadījumos (Takaoka et al. 2003; Hanahan et al. 2000).
- **Onkovīrusi.** Daudzi vīrusi kodē apoptozes inhibītorus (Teodoro et al. 1997), piemēram, BCL-2 homologus, kas spēj inhibēt tādus pro-apoptotiskos proteīnus kā BAX un BAK, kas ir nozīmīgs apoptozes iekšējā ceļā kā citohroma C relīzinga faktors (Polster et al. 2004). Virālo BCL-2 kodē, piemēram, Epšteina-Barra vīruss, kas var izraisīt Burkitta limfomu un aizdegunes karcinomu (Henderson et al 1993). Nereti vīrusi kodē arī kaspāžu un p53 inhibītorus vai attiecīgo gēnu represorus. Piemēram, cilvēka papilomas vīrusa (HPV) onkogēnu kodētais onkoproteīns E6 saistoties pie p53, izraisa tā degradāciju, savukārt HPV E7 proteīns saistās pie retinoblastomas audzējsupresorgēna produkta pRB (Münger et al. 1992).

3. Spēja metastazēt

Spēja metastazēt ir sarežģīts un līdz galam neizprasts process, kas raksturojas ar primārā audzēja šūnu izplatību pa limfātisko un asinsrites sistēmu, līdz tās sasniedz piemērotus orgānus, kuros veido sekundārus audzējus – metastāzes. Pētījumi liecina, ka metastāžu formēšana ir ļoti mazefektīvs process, jo tikai 0,01% asinsritē iekļuvušu vēža šūnu ir spējīgas metastazēt (Fidler 1970), turklāt pastāv sakarība starp primārā audzēja

lokalizāciju un metastāžu izplatību, piemēram, kolorektālais vēzis visbiežāk veido metastāzes aknās, bet priekšdziedzera vēzis – kaulos (Pantel 2004). Šāds metastāžu orgānu specifiskums sākotnēji tika skaidrots ar asinsrites sistēmas morfoloģiju, jo, tā kā vēža šūnas ir ievērojami lielākas par asinsķermenīšiem, tām vajadzētu tikt aizturētām



2 .attēls. Modelis, kas raksturo audu specifiskas metastāzes (Li et al. 2007)

Normālu cilmes šūnu vai mātšūnu transformācija vēža cilmes šūnās (a). Heterogēna primārā audzēja attīstība no vēža cilmes šūnām (b). Primārā audzēja sekretētu pre-metastāzes nišas faktoru izraisīta pre-metastāzes nišas formēšanās (c). Pre-metastāzes nišas izdalīti faktori darbojas kā hemoatraktanti attiecībā uz metastātiskām vēža cilmes šūnām, kas atdalījušās no primārā audzēja (d). Metastātiskām vēža cilmes šūnām formē metastāzes nišu, sasniedzot pre-metastāzes nišu (e). Lokālā mikrovide nosaka, vai Metastātiskām vēža cilmes šūnām proliferēs, formējot metastāzi (f), vai ieies neaktīvā miera stāvoklī, veidojot klusējošu mikrometastāzi (g), kas var tikt pārtraukts, metastātiskajām cilmes šūnām saņemot reaktivācijas signālus (h).

Figure 2. A model for tissue-specific metastasis.

Transformation of normal stem or progenitor cells into cancer stem cells (a). Development of heterogenous primary tumor (b). Pre-metastasis-niche forming factors, secreted by primary tumor, initiate forming of pre-metastasis-niche (c). Factors, secreted by pre-metastasis niche, acts like chemoattractants for mCSCs which have been splitted of primary tumor (d). When reached pre-metastasis niche, mCSCs initiate forming of pre-metastasis-niche (e) and the local environment of niche helps to determine if the mCSCs will either proliferate into metastatic lesion directly (f) or will enter a quiescent period (g), which can be shortened by reactivation signals (h).

kapilāros, tiklīdz tās sasniegušas pirmo orgānu savā ceļā (Ewing 1928), taču šo ideju nopietni iedragāja Stefana Pegeta 1889. gadā izvirzītā „sēklas un augsnes” hipotēze, kas paredzēja, ka vēža šūnas spēj izdzīvot un proliferēt vienīgi noteiktos audos, kas nodrošina nepieciešamo mikrovidi un augšanas faktorus (Fidler 2001). Šobrīd pētījumi vedina uz domām, ka primārais audzējs izdala īpašus pre-metastāzes nišas faktorus, kuri noteiktos audos ierosina pre-metastāzes nišas formēšanos. Pre-metastāzes niša, savukārt, izdala migrēšanas (homing) un noenkurošanās (anchorage) faktorus, kas, darbojoties kā hemoatraktanti, pievilina vēža cilmes šūnas, kas atdalījušās no primārā audzēja. Kad vēža cilmes šūna sasniedz pre-metastāzes nišu, tā sāk formēt metastāzes nišu, no kuras tālāk var attīstīties metastāze vai neaktīva mikrometastāze (2.attēls). Metastāzes ir nāves cēlonis 90% vēža gadījumos (Li et al. 2007).

Pēdējos gados atzinību ir guvusi ideja, ka metastatiskajos procesos var tikt iesaistīti epiteliāli mezenhimālās tranzīcijas (EMT) mehānismi, kas pirmo reizi novēroti embrionālajā attīstībā kā epiteliālo šūnu konversija mezenhimālā fenotipā, zaudējot polaritāti un starpšūnu kontaktus, kā arī notiekot būtiskām izmaiņām citoskeleta struktūrā, kas rezultējas ar spēju ekspresēt mezenhimālos proteīnus un migrēt, šādi spēlējot nozīmīgu lomu embrija attīstībā (Thiery 2002). Domājams, ka epiteliālā audzēja gadījumā var tikt izmantoti EMT mehānismi, lai konvertētu diferencētas vēža šūnas dediferencētās šūnās ar palielinātu metastātisko potenciālu (Kang et al. 2004).

4. Spēja inducēt angiogēzi

Sakarā ar barības vielu un skābekļa trūkumu, nevaskularizēts audzējs parasti nepārsniedz 2mm³ tilpumu, tādēļ ļoti būtisku lomu audzēja attīstībā spēlē audzēja šūnu spēja inducēt angiogēzi (Schmitt et al. 1999). Audzēja šūnu spēja inducēt angiogēzi balstās uz tādu augšanas faktoru produkciju un sekrēciju, kas veicina asinsvadu zarošanos un augšanu. No šādiem faktoriem visbiežāk sastopami VEGF (vaskulārā endotēlija augšanas faktors) un bFGF (galvenais fibroblastu augšanas faktors) (Eppenberger et al. 1998). Šobrīd zināms, ka audzēja šūnas nespēj producēt enzīmu PKG (cGMP atkarīgā proteīnkināze G). Normālās šūnās PKG ierobežo β-katenīnu, kas stimulē angiogēzi (Kwon et al. 2008).

5. Nejutība pret ārējiem augšanu inhibējošiem faktoriem

Normālos audos tiek uzturēta homeostāze ar augšanu inhibējošiem signāliem, kas darbojas pretī augšanas faktoru ietekmei, novirzot šūnu pārejošā miera stāvoklī vai postmitotiskā stāvoklī, kas saistīts ar šūnas diferencēšanos un proliferācijas potenciāla zudumu. Daudzi, iespējams, visi, antiproliferatīvie signāli tiek novadīti caur

retinoblastomas proteīnu pRb un diviem tā radiniekiem – p107 un p130. Traucējumi pRb ceļā ļauj vēža šūnai proliferēt arī augšanas inhibītoru klātbūtnē (Weinberg 1995).

6. Augšanas faktoru pašpietiekamība

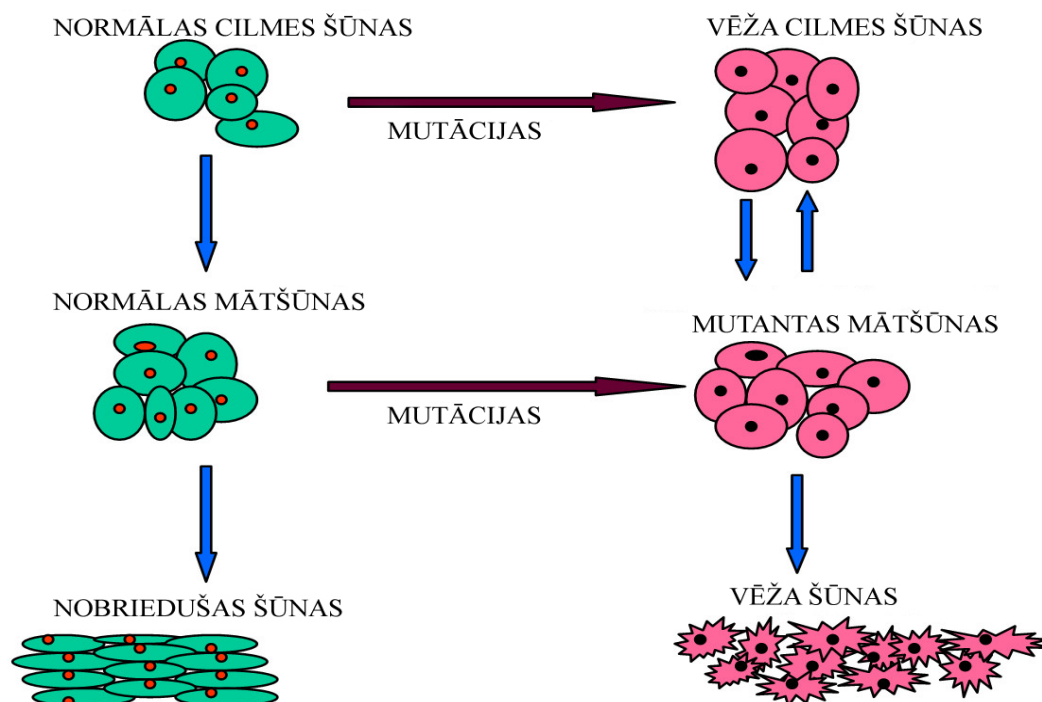
Lai šūna spētu proliferēt, tai jāsaņem ekstracelulāri augšanas faktori. Vēža šūnas spēj pašas sintezēt daļu no nepieciešamajiem augšanas faktoriem, uz kuriem arī pašas atokrīni atbild (Fedi et al 1997). Dažos gadījumos vēža šūnas pilnībā zaudējušas nepieciešamību pēc noteiktiem augšanas faktoriem, piemēram, RAS protoonkogēna mutācijas gadījumā var translēties hiperaktīvs RAS G-proteīns, kas ir aktīvs, pat ja pie atbilstoša membrānas receptora nesaistās augšanas faktors (Medema et al. 1993).

Šobrīd pastāv divi konkurējoši modeļi, kas mēģina izskaidrot audzēja attīstību (Reya et al. 2001):

1. **Stohastiskais modelis** – paredz, ka jebkura audzēja šūna ir tumorigēna un tās ieiešanu šūnas ciklā nosaka gadījuma rakstura notikumi.
2. **Hierarhijas modelis** – paredz, ka tikai neliela audzēja šūnu subpopulācija ir atbildīga par audzēja augšanu un metastāžu formēšanos. Šis modelis ir pamatā vēža cilmes šūnu hipotēzei.

Vēža cilmes šūnu eksistenci jau 1855. gadā paredzēja R. Virhovs, izvirzot hipotēzi, ka audzējs attīstās no šūnām, kas līdzinās embrionālām cilmes šūnām (Virchow 1855), taču tā laika tehnoloģijas nebija pietiekami attīstītas, lai sniegtu iespēju pārbaudīt šo hipotēzi, tādēļ pirmie taustāmie pierādījumi vēža cilmes šūnu pastāvēšanai tika iegūti tikai 1994. gadā, kad akūtā mieloīdā limfomā tika atrastas šūnas ar virsmas fenotipu CD34⁺/CD38⁻, kas ir raksturīgs šūnām ar cilmes šūnu īpašībām (Lapidot et al. 1994). Turpmākajos gados līdzīgas cilmes-veida šūnas tika atrastas arī virknē citu audzēju tipu. Noskaidrots, ka aizkuņģa dziedzera, resnās zarnas un smadzeņu audzēju cilmes-veida šūnām raksturīgs cilmes šūnu virsmas glikoproteīns CD133. Injicējot resnās zarnas CD133⁺ šūnas pelēm ar novājinātu imūnsistēmu, daudzos gadījumos tās izrādīja spēju formēt metastāzes, turpretī neviena no 10⁴ injicētām CD133⁻ šūnām šādu spēju neizrādīja (O'Brien et al. 2007). Turpinoties pētījumiem, iegūtie pierādījumi vēža cilmes šūnu pastāvēšanai bija pietiekami, lai rastos nepieciešamība precīzi definēt vēža cilmes šūnas. Šādu vēža cilmes šūnu definīciju 2006. gadā sniedz M. F. Klērks: „Vēža cilmes šūnas ir audzēja šūnas, kam piemīt spēja veidot heterogēnas vēža šūnu līnijas un pašatjaunoties” (Clarke et al. 2006), kur ar pašatjaunošanos būtu jāsaprot vēža cilmes šūnu spēju asimetriski daloties, ne tikai veidot heterogēnas diferencētu vēža šūnu populācijas, bet arī saglabāt vēža cilmes šūnu līniju.

Viens no vēža cilmes šūnu izpētes pamatjautājumiem ir šo šūnu neskaidrā izcelsme. Ja šādu šūnu avots ir nobriedušas, diferencētas šūnas, dediferenciācijā un pašatjaunošanās spēju nodrošināšanā galveno lomu spēlētu akumulētu onkogēnu mutāciju kopums, taču šī hipotēze ir maz ticama, jo diferencētu šūnu mūža ilgums vairumā gadījumu ir pārāk īss, lai tās spētu akumulēt visas nepieciešamās mutācijas, līdz ar to daudz ticamākas šķiet versijas, kas paredz vēža cilmes šūnu attīstību no normālām cilmes šūnām vai mātšūnām (3. attēls) (Allan et al.



3. attēls. Vienkāršots modelis, kas ilustrē hipotēzi par vēža cilmes šūnu izcelsmi (Sagar et al. 2007).

Figure 3. Simplified model of origin of the cancer stem cells.

2007), tomēr jauni pētījumi parāda, ka nepieciešama vienīgi Oct-4, c-Myc, Sox2 un klf4 ekspresija, lai nobriedušus fibroblastus pārvērstu par šūnām, kas morfoloģiski un fizioloģiski līdzinās embrionālām cilmes šūnām (Barnhart et al. 2007). Turpretī, ja vēža cilmes šūnas attīstās, transformējoties normālām cilmes šūnām, pašatjaunošanās spējas nodrošināšanai tās varētu izmantot jau eksistējošus regulatoros ceļus, taču, tā kā cilmes šūnas ir sastopamas ārkārtīgi reti, ticamāka ir versija par vēža cilmes šūnu izcelsmi no mātšūnām (progenitor cells) (Kucia 2006, Li 2007), ko apstiprina arī novērojumi, ka Bcl-2 un BCR/ABL (sastopams 90% hroniskas mieloīdas leukēmijas gadījumos) koekspresija mieloīdās mātšūnās ir pietiekama, lai izraisītu leukēmiju pelēm (Jaiswal et al. 2003).

Jauns modelis paredz vēža cilmes šūnu rašanos cilmes šūnu saplūšanas rezultātā. Konceptuāli, saplūšana starp cilmes šūnām un mutantām šūnām var novest pie pašatjaunošanās potenciāla atgūšanas. Neseni pētījumi parāda, ka kaulu smadzeņu BMDC šūnas ir spējīgas saplūst ar neoplastiskām epitēlija šūnām (Rizwi et al. 2006) Šāds šūnu saplūšanas modelis spētu izskaidrot audzēja šūnām bieži raksturīgo aneiploīdiju (Bjerkvig et

al. 2005). Par labu šai hipotēzei liecina arī daudziem vīrusiem piemītoša spēja sapludināt šūnas (Duelli et al. 2007).

Pretstatā klasiskajam gadījumam, kad vēzis ir piesaistīts konkrētam saimniekorganismam, no kura šūnas, tas ir attīstījies, zināmi arī divi kontagiozi vēža tipi – suņu seksuāli transmisīvais vēzis (CTVT, infekciozā sarkoma) un Tasmānijas velnsomaiņu sejas vēzis (DFTD). Sākotnēji tika domāts, ka abos gadījumos vēzi izraisa kāds vīruss, līdzīgi kā HPV var izsaukt dzemdes kakla vēzi, taču šobrīd ir zināms, ka pārnēsējaģents ir pati vēža šūna, kas pirmajā gadījumā izplatās seksuālu kontaktu ceļā suņu un citu *Canis* ģints sugu populācijās, bet otrajā gadījumā barošanās, savstarpējo cīņu un agresīvas pārošanās laikā Tasmānijas velnsomaiņu (*Sarcophilus harrisii*) populācijās (Murgia et al 2006).

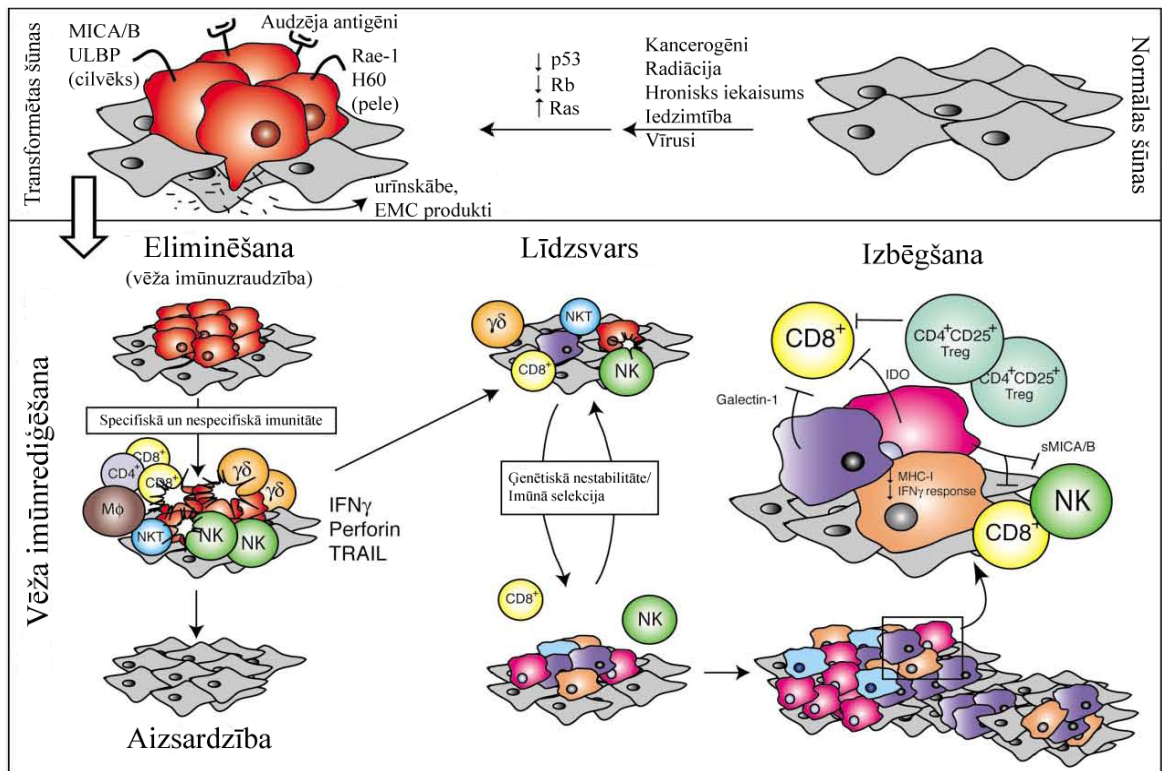
1.2. Ļaundabīgo audzēju imunoloģija

Imūnsistēmas nespecifisko un specifisko mehānismu kopumu, kas nodrošina aizsardzību pret vēža attīstību, sauc par vēža imūnrediģēšanu. Vēža imūnrediģēšana norisinās trīs fāzēs – eliminēšanas fāzē, līdzsvara fāzē un izbēgšanas fāzē (Dunn et al. 2004^b) (4. attēls):

1. Eliminēšanas fāze

Eliminēšanas fāze reprezentē vēža imūnuzraudzības koncepciju, ietverot nespecifiskās un specifiskās imunitātes mehānismu kompleksu darbību, lai eliminētu transformētas šūnas. Pilnīga imūnrediģēšanas procesa gadījumā vēža šūnas tiek eliminētas šajā fāzē, nesasniedzot līdzsvara un izbēgšanas fāzes. Eliminēšanas fāze tiek iedalīta četros soļos (Dunn et al. 2004^b):

- 1) Audzēja šūnu izdalīti pre-iekaisuma faktori un hemokīni izsauc nespecifiskās imūnās sistēmas šūnu rekrutāciju uz audzēja saitū (Wrenshall et al. 1999). Sasniedzot audzēju, NKT, $\gamma\delta$ T, NK šūnas un/vai makrofāgi spēj atpazīt tādas audzēja šūnām raksturīgas molekulas kā NKG2D ligandus (Benlagha et al. 2000). Šādai audzēja šūnām specifisku molekulu atpazīšanai ir kritiska loma turpmākā imūnās sistēmas pretvēža aktivitātē, kas raksturojas ar interferona γ producēšanu.



4. attēls. Vēža imūnrediģēšanas trīs fāzes (Dunn et al. 2004^a).

Mutgēnu faktoru ietekmē transformējoties normālām šūnām (pelēkas), tās kļūst par vēža šūnām (sarkanas), kas pat agrās tumorigenēzes stadijās ekspresē audzēja-specifiskus marķierus, kā arī ģenerē pre-iekaisuma signālus (urīnskābe u.c.), kas iniciē vēža imūnrediģēšanas procesu. Imūnrediģēšanas eliminācijas fāzē imūnuzraudzības tīkls, ko veido nespecifiskās un specifiskās imunitātes mehānismi, veic mērķtiecīgu audzēja šūnu elimināciju, tomēr, ja šis process cieš neveiksmi, audzēja šūnas var ieiet līdzsvara fāzē, ko raksturo imūnās sistēmas selektīva iedarbība un vēža šūnu diversitāti, līdz ar to, diverģējot vēža šūnām, izdzīvo tās, kas izrāda rezistenci imūnās sistēmas darbībai. Rezistenci ieguvušās šūnas ieiet izbēgšanas fāzē un turpina nekontrolēti proliferēt.

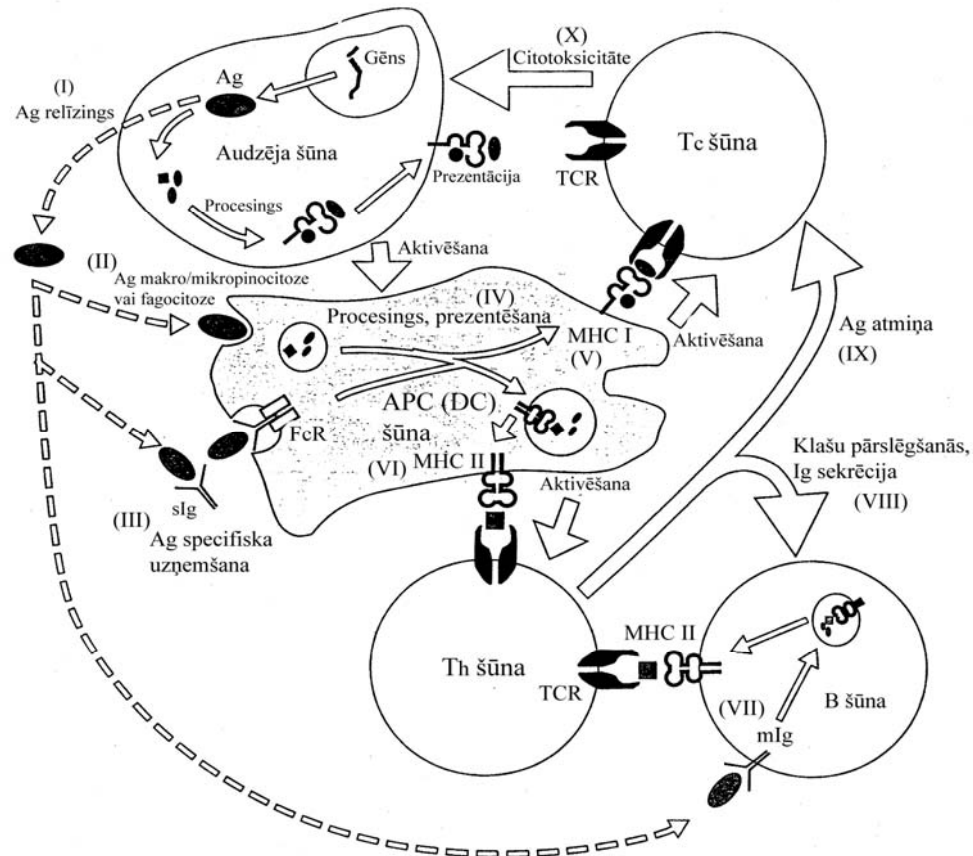
Figure 4. The three phases of the cancer immunoeediting process.

Normal cells (gray) subjected to oncogenic stimuli ultimately undergo transformation and become tumor cells (red), which even at early stages of tumorigenesis may express distinct tumor-specific markers and generate proinflammatory "danger" signals (uric acid etc.) that initiate the cancer immunoeediting process. In the elimination phase of immunoeediting, mechanisms of innate and adaptive immunity, which comprise the cancer immunosurveillance network, may eradicate the developing tumor, however, if this process is not successful, tumor cells may enter the equilibrium phase. In this phase the immune system can selectively affect the diversity of tumor cells resulting in the survival of only those cancer cells which resist to immune attack. Those cells may enter in the escape phase and proliferate unaffected by immune system.

- 2) Imūnās sistēmas šūnu atbrīvotais interferons- γ izraisa lokālu hemokīnu sintēzi, izsaucot papildus imūnās sistēmas šūnu rekrutāciju uz audzēja saitu un ekstracelulārā matricas remodelēšanas blakusprodukti stimulē audzējā infiltrējušos makrofāģus izdalīt nelielu daudzumu interleikīna-12 (Hodge-Dufour et al. 1997), kas, savukārt, liek audzējā infiltrējušām NK šūnām izdalīt nelielu daudzumu interferona γ , stimulējot makrofāģus izdalīt papildus interleikīnu-12, kā rezultātā, mijiedarbojoties makrofāģiem un NK šūnām, tiek izdalīts liels daudzums interferona γ (Bancroft et al. 1991), izsaucot virkni interferona γ atkarīgo procesu, tai skaitā antiproliferatīvos, pre-apoptiskus un

angiostatiskos, kas izraisa daļas audzēja šūnu bojāeju un audzēja antigēnu izdalīšanos ekstracelulārajā telpā.

- 3) Nespecifiskās imūnās sistēmas darbības rezultātā iznīcināto audzēja šūnu antigēnus vai antigēnus saturošās atliekas endocitozes ceļā uzņem uz audzēja



5. attēls. Specifiskā imūnā atbilde uz audzēja antigēniem (Sahin et al 1997).

Specifiskajā imūnajā atbildē uz audzēja antigēniem iesaistītas CD4+ T_h šūnas, CD8+ T_c šūnas un B šūnas, kuras aktivē profesionālas antigēnus prezentējošas šūnas (dendritiskās šūnas). Sekrēcijas vai nespecifiskās imūnās atbildes izraisītas audzēja šūnu destrukcijas rezultātā atbrīvotos antigēnus (I) pinocitozes, fagocitozes (II) vai FcR mediētās endocitozes (III) ceļā uzņem antigēnus prezentējošas APC šūnas. Uzņemtie antigēni tiek procesēti (IV) un prezentēti kopā ar MHC I klases molekulām (V) T_c šūnām un kopā ar MHC II klases molekulām (VI) T_h šūnām, izraisot attiecīgo šūnu aktivāciju. Audzēja antigēnu uzņem arī B šūnas, izmantojot membrānas Ig (VII) un prezentē tu kopā ar MHC II klases molekulu T_h šūnām. Antigēnus prezentējošo šūnu un B šūnu antigēnu prezentācijai T_h šūnām ir kritiska loma specifiskajā imūnajā atbildē, jo tā izsauc klašu pārslēgšanos un IgG/A antivielu sekrēciju B šūnām (VIII), kā arī ilgstošo T šūnu antigēnu atmiņu (IX). T_c šūnu aktivācija (V) ieslēdz šo šūnu citotoksisko aktivitāti, kas izpaužas kā T_c izraisīta audzēja šūnu lizēšana (X).

Figure 5. Specific immune responses to tumor antigens.

Specific immune responses to tumor antigens involve CD4+ T_h, CD8+ T_c and B cells which are activated by professional antigen presenting cells (dendritic cells). Tumor antigens (I) released by secretion or innate immune response mediated tumor cell lysis are captured by antigen presenting cells, by either pinocytosis, phagocytosis (II) or FcR mediates endocytosis (III). Uptaken antigens are processed (IV) and presented by MHC I (V) to T_c cells and by MHC II (VI) to Th cells leading to the activation of these cells. Tumor antigens are captured also by B cells and this is driven by membrane Ig (VII) leading to MHC II antigen presentation to Th cells. Antigen presentation to Th cells by both antigen presenting cells and B cells is critical for the adaptive immune response as it induces class switching and the secretion of IgG/IgA by B cells (VIII) and also long lasting T cell memory responses (IX). Activation of T_c cells (V) triggers cytotoxic activity of T_c cells which induces tumor cell lysis (X).

saitu rekrutētas dendrītiskās šūnas. Antigēnus nesošas nobriedušas dendrītiskās šūnas migrē uz limfmezgliem (Dunn et al. 2004^b), kur tās kalpo kā starpposms starp nespecifisko un specifisko imūno sistēmu, procesētus antigēnus kopā ar MHC II vai MHC I klases molekulām prezentējot attiecīgi CD4+ T_h šūnām un CD8+ T_c šūnām, kas izsauc attiecīgo šūnu aktivāciju. Antigēnus ar membrānas Ig starpniecību uzņem arī B šūnas, kas tos procesē un prezentē T_h šūnām kopā ar MHC II klases molekulām. Dendrītisko APC šūnu un B šūnu antigēnu prezentācija T_h šūnām ierosina klašu pārslēgšanos un Ig produkciju B šūnās, kā arī ilgstošu antigēnu atmiņu T šūnām (Sahin et al 1997) (5. attēls).

- 4) Šajā solī norisinās audzēja specifisku CD4+ T_h un CD8+ T_c šūnu rekrutācija uz audzēja saitu un pilnīga audzēja eliminēšana. Audzēja specifiskās CD8+ T_c šūnas efektīvi atpazīst vēža šūnas un eliminē tās, izmantojot gan tiešus, gan netiešus mehānismus (Dunn et. al. 2004^b).

2. Līdzsvara fāze

Līdzsvara fāzē starp imūno sistēmu un audzēja šūnām iestājas dinamisks līdzsvars, kas raksturojas ar uz izdzīvojušām audzēja šūnām vērstu imūnās sistēmas darbības izraisītu selekcijas spiedienu, kā rezultātā audzēja augšana tiek ierobežota, to pilnībā neiznīcinot. (Dunn et al. 2004^b). Šī fāze, iespējams, ir visgarākā no imūnredīgēšanas trīs fāzēm un var ilgt vairākus gadus (Loeb et al. 2003). Šajā periodā galvenie mehānismi, kas audzējam ļauj pārciest pastāvīgus imūnās sistēmas uzbrukumus, ir audzēja šūnu heterogenitāte un ģenētiskā nestabilitāte (Loeb 1991).

3. Izbēgšanas fāze

Izbēgšanas fāzē uz audzēja šūnām vairs nedarbojas imūnās sistēmas spiediens, jo tās ieguvušas rezistenci pret imūnās sistēmas iedarbības mehānismiem, imūnsupresīvu aktivitāti un/vai īpašības, kas ļauj tām palikt „neredzamām” imūnās sistēmas šūnām. Šādas audzēja šūnu īpašības nosaka dažādi mehānismi, piemēram (Dunn et al. 2004^b):

- Imūnsupresīvu citokīnu sintēze
- Antigēnu neekspresēšana
- Nejutība pret interferonu- γ

1.3. Ļaundabīgo audzēju antigēnu identificēšana

Atšķirībā no dzīvnieku modeļiem, cilvēka neoplastiskiem audiem specifisku antigēnu eksistence tika nepārprotami demonstrēta tikai 1991. gadā, kad T. Būna (Boon) grupa aprakstīja melanomas antigēnu MAGE-1 (van der Bruggen et al. 1991), taču, attīstoties

antigēnu identificēšanas metodikai, jau 2002. gadā zināmo audzēja antigēnu skaits pārsniedza 2,5 tūkstošus (Yuichi et al. 2005). Šādas zināšanas par audzēju antigēniem paver jaunas ļaundabīgo audzēju diagnostikas un terapijas iespējas.

Vairums identificēto audzēja antigēnu iespējams klasificēt pēc to ekspresijas rakstura, funkcijām vai izcelsmes, ierindojot tos kādā no sekojošām kategorijām (Jäger et al. 2000, Sahin et al 1997):

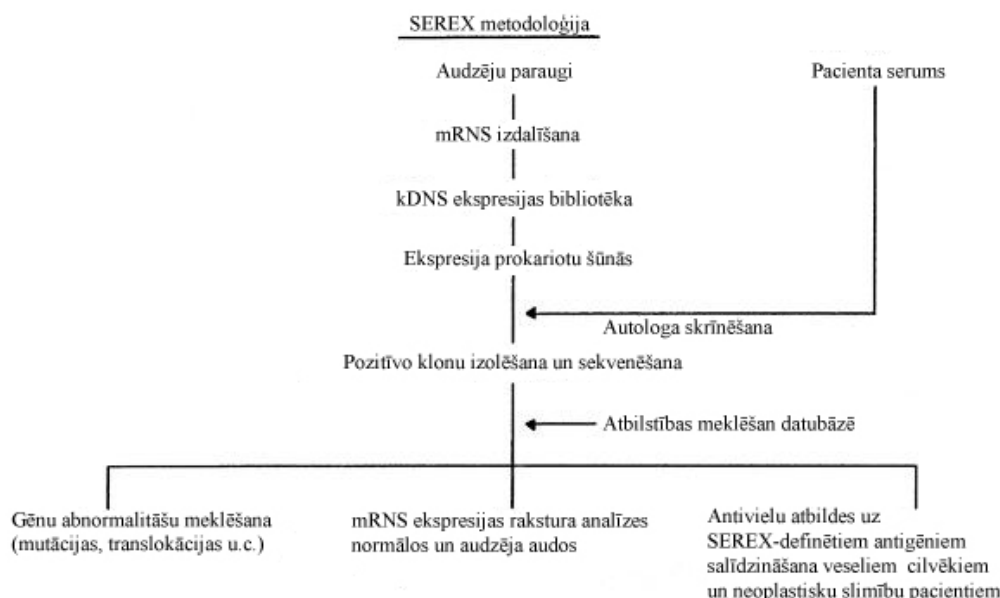
- 1. Vēža-sēklinieku (cancer-testis) antigēni** – antigēni, kuri raksturīgi audzēja šūnām, bet nav sastopami normālos ausos, izņemot sēkliniekus, kas ir imūn-privileģēts rajons. Pie šādiem antigēniem pieskaitāmi MAGE-1, MAGE-2, MAGE-4a, HOM-MEL-40, NY-SO-1 u.c.(De Plaen et al. 1994, Chen et al. 1997). NY-ESO-1 ir viens no visimunogēnākajiem audzēja antigēniem un izraisa imūno atbildi 40-50% pacientiem ar NY-SO-1⁺ audzēju (Jäger et al. 2000).
- 2. Diferenciācijas antigēni** – antigēni, kas raksturīgi kādas noteiktas izcelsmes vēža šūnām, kā arī tādas pašas izcelsmes normālām šūnām. Pie šādiem antigēniem var pieskaitīt, piemēram, melanomai raksturīgu antigēnu - tirozināzi, kas sastopama arī normālos melanocītos (Coulie et al. 1994).
- 3. Mutantie antigēni** – antigēni, kas ekspresēti no mutējušiem gēniem. Šādi antigēni sastāda tikai nelielu daļu no visiem zināmajiem audzēju antigēniem (Sahin et al 1997). Pie šādiem antigēniem pieskaitāmi MUM-1, p53, CDK4 u.c. (Jäger et al. 2000).
- 4. Pārmērīgi ekspresētu gēnu produkti** – antigēni, kas sastopami gan audzēja šūnās, gan normālās šūnās, taču audzēja šūnās to ekspresijas apjoms var būt daudzkārt palielināts, pārsniedzot kritisko sliekšni, virs kura sāk izpausties imūnā atbilde (Viola et al. 1996). Pie šīs grupas pieskaitāmi HER2/neu, p53 u.c. (Jäger et al. 2000).
- 5. Alternatīvie splaisinga varianti** – ar audzēju asociēti splaisinga varianti, kam piemīt imunogēna aktivitāte, piemēram, Hodžkina limfomai (Hodgkin's lymphoma) raksturīgs antigēns restīns (Sahin et al. 1995).
- 6. Ar posttranslācijas modifikācijām saistītie** - Antigēni, kas tiek ekspresēti vienādos apjomos gan audzēja, gan normālos audos, taču imūno atbildi, pateicoties posttranslācijas modifikācijām, izraisa vienīgi audzēja pacientiem. Pie šīs grupas pieskaitāms, piemēram, HOM-MEL-2.4 (Skipper et al. 1996, Chen et al. 1996).
- 7. Virālie antigēni** – virālas izcelsmes antigēni, piemēram, HERV-K10 retrovīrusa env proteīns, kas sastopams nieru audzējos (Ono et al. 1986).

Audzēju antigēnu meklēšanai un identificēšanai ir izstrādātas vairākas metodes:

- 1. Autologā seroloģiskā antigēnu identificēšana** – metodi 20.gs. 70. gados attīstīja Loida J. Olda grupa un tā balstās uz autologa seruma antivielu spēju reaģēt ar audzēja

antigēniem. Metodē tika izmantotas kultivētas vēža šūnu līnijas un autologs serums, lai veicot izvērstus absorbcijas testus, noteiktu antigēnu-antivielu saistību. Metodes ierobežotais potenciāls ļauj identificēt tikai nelielu daļu audzēju antigēnu (Sahin et al. 1997, LICR 2007).

2. **T_c šūnu epitopu klonēšana** – metode attīstīta 20.gs. 90. gadu sākumā un tā balstās uz audzēja kDNS bibliotēkas ieklonēšanu atbilstošu MHC-1 ekspresējošās mērķšūnās un sekojošas uz MHC-1 prezentēto antigēnu epitopu identificēšanas, izmantojot no audzēja infiltrāta izdalītas T_c šūnu līnijas. Šī metode ir ļoti darbietilpīga, jo nepieciešamas T_c šūnu līnijas un iemaņas klonēšanā (Yang et al. 2006, Yang et al. 2005).
3. **MHC-1 saistīto peptīdu eluēšana** – metode baltās uz peptīdu eluēšanu no audzēja šūnām vai attīrītām audzēja MHC-1 molekulām un uznešanas uz APC šūnām, kam seko attiecīgo APC reaktivitātes testi ar T_c šūnām. Ar T_c reaģējošie antigēni tālāk tiek attīrīti un sekvenēti. Šī metode prasa iemaņas proteīnu ķīmijā, proteīnu attīrīšanā, kā arī masspektrometrijā (Yang et al. 2005).
4. **Diferenciālās ekspresijas analīzes** – izmanto jaunākos tehnoloģiskos risinājumus, lai atklātu RNS un proteīnus, kas tiek atšķirīgi ekspresēti normālās un audzēja šūnās (LICR 2007).



6. attēls. SEREX pieeja cilvēka audēju antigēnu identificēšanā (Chen et al. 2004)

Figure 6. SEREX approach to defining human tumor antigens.

5. **SEREX** (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) – metodi 1995. gadā uz autologās seroloģiskās antigēnu identificēšanas metodes bāzes izstrādāja M. Freundšuh (Pfreundschuh). Īsi pēc metodes izstrādes tika aizsākta Starptautiskā SEREX Programma (International SEREX Program), kuras ietvaros Vēža

Imunoma Datubāze (Cancer Immunome Database), kas ir lielākā publiski pieejamā vēža antigēnu datubāze, papildināta jau par aptuveni 2000 antigēnu sekvencēm (LICR 2007).

Klasiskajā SEREX metodē (6. attēls) no svaigiem audzēja paraugiem, izmantojot λ -fāga vektoru, tiek konstruēta kDNS bibliotēka un ekspresēta *Escherichia coli* baktērijā. Rekombinantie λ -fāgi no plakiem tiek pārnesti uz nitrocelulozes membrānas un skrīnēti ar augsta titra IgG antivielām, kas pārstāvētas pacienta serumā. Izmantojot ar enzīmu konjugētas sekundārās antivielas pret cilvēka IgG, kā antigēni tiek identificēti ar seruma IgG reaģējošie λ -fāgu rekombinantie peptīdi un šādi pozitīvi kloni iegūti monoklonālā veidā, lai, veicot DNS sekvenēšanu, noteiktu insertētās DNS sekvenci (Sahin et al. 1997). Šādai metodei piemīt vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar iepriekšminētajām, piemēram, svaigu audzēja audu izmantošana ļauj kDNS bibliotēkā iekļaut lielāko daļu audzēja šūnās ekspresēto proteīnus kodējošo gēnu un izvairīties no *in vitro* artefaktiem. Metode ļauj arī detektēt ne tikai šūnas virsmas, bet arī iekššūnas antigēnus (Túreci et al. 1997).

Lai gan SEREX koncepcija liekas vienkārša, veiksmīgai metodes pielietošanai nepieciešams apiet virkni tehnisku grūtību (Chen et al. 2004):

- 1) Cilvēka serumā raksturīgas antivielas, kas reaģē ar baktērijas vai fāga komponentiem. Šī problēma parasti tiek risināta, atkārtoti absorbējot atšķaidītu serumu ar baktēriju un fāgu lizātu (Chen et al. 2004)
- 2) IgG ekspresējošu B šūnu klātbūtne audzējā rezultējas ar IgG kodējošu sekvenču iekļaušanos kDNS bibliotēkā un imunoskrīningā dod viltus pozitīvus signālus. Šīs problēmas risināšanai tiek izmantots preskrīnings (Chen et al. 2004).
- 3) Daļa no seruma antivielām, kas reaģē ar kDNS bibliotēku, ir autoantivielas, kurām ir maza vai vispār nekāda saistība ar audzēju. Šī problēma tiek risināta, izslēdzot IgM un lietojot serumu atšķaidījumā no 1:100 līdz 1:1000, lai fokusētos vienīgi uz augsta titra IgG (Chen et al. 2004).

Šobrīd eksistē liels skaits dažādu SEREX metodes modifikāciju, kuras var iedalīt sekojošās grupās (Chen et al. 2004):

- 1) Variācijas kDNS bibliotēkas avota izvēlē;
- 2) Variācijas vektoru sistēmas izvēlē;
- 3) Variācijas antivielu avota izvēlē;
- 4) SEREX kombinācijā ar citām metodēm, piemēram, fāgu displeja tehnoloģijām vai sērijveida gēnu ekspresijas analīzēm (SAGE).

1.4 Fāgu displeja sistēmas

Fāgu displejs ir molekulāra tehnoloģija, kas ļauj ekspresēt svešus proteīnus vai peptīdus uz fāga daļiņas virsmas himeru proteīnu veidā. Metode tiek realizēta, inkorporējot attiecīgo proteīnu kodējošo nukleotīdu sekvenci fāga virsmas kapsomēra gēna sastāvā, līdz ar to var tikt izveidota replicēties spējīga sistēma, kas satur eksogēnu nukleotīdu sekvenci un uz virsmas prezentē tai atbilstošu peptīdu, sniedzot iespēju vienlaikus atlasīt gan interesējošo proteīnu vai peptīdu gan to kodējošo nukleotīdu sekvenci. Viena no galvenajām šādas sistēmas priekšrocībām ir iespēja reprezentēt milzīgu skaitu dažādu peptīdu, piemēram, tipiskas fāgu displeja bibliotēkas prezentēto peptīdu diversitāte ir ap 10^{10} (Willats 2002).

Fāgu displeja tehnoloģijas pirmsākumi datējami ar 1985. gadu, kad Džordžs Smits aprakstīja eksogēnu peptīdu ekspresiju uz filamenta bakteriofāga virsmas (Antonio 2005), kā arī attīstīja vienkāršas procedūras konkrētus eksogēnos peptīdus ekspresējošu fāgu selekcijai (Rosenberg et al 1996). Kopš šī pētījuma pagājuši teju 25 gadi, kuru laikā metode ir plaši lietota fāgu displeja bibliotēku (heterogēnu fāgu klonu mikstūru, kur katrs klons nes atšķirīgu eksogēnu nukleotīdu sekvenci un uz virsmas prezentē tai atbilstošus peptīdus (Smith et al 1997)) konstruēšanai, kā rezultātā izstrādātas dažādas pieejas šādu bibliotēku skrīnēšanai un izdarīti būtiski atklājumi imunoloģijā, šūnu bioloģijā un farmakoloģijā (Antonio 2005). Vairumā gadījumu fāgu displeja sistēmā par vektoriem tiek izmantoti filamenta fāgi (M13, fd un f1) (Smith et al 1997), taču pēdējos gados lielu popularitāti ir guvušas uz lītiskiem T4, T7 un λ fāgiem balstītas vektorsistēmas.

Filamenta fāgi ir aptuveni 1 μ m gari un 6nm diametra lokani pavedienuveida bakteriofāgi. 87% no fāga masas sastāda spirāliski izkārtots mažorais apvalka proteīns pVIII, veidojot proteīnu caurulīti, pie kuras iekšējās virsmas saistīta fāga ssDNS. Caurulītes vienu galu noslēdz piecas minoro apvalka proteīnu pIII un pVI kopijas, bet otru galu, analogiski, veido minorie apvalka proteīni pVII un pIX. Filamenta fāgu displeja sistēmās svešie peptīdi var tikt piesaistīti apvalka proteīniem pIII, pVI vai pVIII, insertējot kodējošo sekvenci attiecīgi III, VI vai VIII gēnā. Lai displeja sistēma funkcionētu, peptīdam jābūt piesaistītam pie fāga virsmas proteīnu rajoniem, kas eksponēti uz fāga daļiņas ārpusi (pIII N-gals un vidus, pVI C-gals, pVIII N-gals) (Smith et al 1997). Fāga daļiņa spēj prezentēt 3-5 eksogēnu peptīdu kopijas, ja tās piesaistītas minorajam pIII apvalka proteīnam vai pat līdz 2700 nelielu (līdz sešām aminoskābēm) peptīdu kopijām, ja tās saistītas pie mažorā pVIII apvalka proteīna (Antonio 2005), taču, ja mažorajam proteīnam tiek piesaistīti peptīdi, kas garāki par astoņām aminoskābēm, fāga daļiņas savākšanās var notikt vienīgi savvaļas tipa pVIII klātbūtnē (Smith et al 1997). Tā kā filamenta fāgu kapsīdas savākšanās notiek saimniekšūnas periplazmā,

vienīgi tie himērie proteīni, kas spēj šķērsot šūnas iekšējo membrānu, var tikt inkorporēti kapsīdas sastāvā (Kalniņa et al 2008).

Vairākas filamenta fāgu displeja sistēmu nepilnības iespējams apiet, izmantojot lītisko fāgu displeja sistēmas. Plaši izmantota ir T7 sistēma, kuras ietvaros eksogēni peptīdi tiek prezentēti uz T7 fāga virsmas. T7 ir kompleksas simetrijas bakteriofāgs ar ikosaedrisku 55nm diametra galvas daļu, kurā ietverta 40kbp gara dsDNS, 28,5nm garu 19nm diametra astes daļu un sešām astes šķiedrām. Fāga ikosaedriskā galva ir veidota no 415 proteīnu 10A un 10B kopijām, kas izkārtoti 60 heksamēros un 11 pentamēros. 10B ir 10A kapsīdas proteīna versija ar nobīdītu translācijas rāmi aiz 341. aminoskābes. Lai gan 10B parasti sastāda ap 10% no kapsīdas proteīniem, funkcionālu kapsīdu spēj izveidot jebkādas 10A un 10B skaita attiecības. T7 displeja sistēmā eksogēnie peptīdi tiek prezentēti C galā proteīnam 10B, kuru kodējošam kapsīdas gēnam izgriezts translācijas rāmja nobīdes saits, līdz ar to izslēdzot alternatīvas kapsīdas proteīna formas veidošanās iespēju. Šāda sistēma ļauj vienā fāga daļiņā inkorporēt sākot no 415 nelieliem (līdz 50 aminoskābēm) peptīdiem līdz pat vienam, maksimāli 1200 aminoskābes garam proteīnam, izmantojot normālu 10A kapsīdas proteīnu producējošas *E.coli* saimniekšūnu līnijas. Fāga daļiņu savākšanās norisinās *E.coli* šūnā un, tās tiek atbrīvotas, šūnai lizējoties, līdz ar to, atšķirībā no filamenta fāgu displeja sistēmām, himerajiem kapsīdas proteīniem nav jābūt spējīgiem šķērsot membrānu, turklāt T7 fāga replikācija notiek ātrāk, nekā tas raksturīgs filamenta un λ fāgiem (Rosenberg et al 1996).

Fāgu displeja peptīdu bibliotēka sniedz iespēju atlasīt fāgu klonus pēc to afinitātes pret konkrētiem mērķa proteīniem vai šūnām. Šāda fāgu displeja ligandu afinitātes bagātināšana ietver piecus fundamentālus soļus (Antonio 2005):

1. Primārās bibliotēkas konstruēšana;
2. Fāga daļiņu specifiska piesaiste pie mērķa proteīniem vai šūnām;
3. Nesaistīto fāga daļiņu aizvākšana;
4. Saistīto fāgu eluēšana un amplificēšana;
5. Cikla atkārtošana 2-4 reizes.

Tā kā katram fāga apvalka himerā proteīna fenotipam atbilstošais genotips ir ietverts fāga daļiņā, pēc himeru proteīnu afinitātes selekcijas iespējams sekvenēt to kodējošo DNS, kā arī veikt ar to turpmākas manipulācijas (Willats 2002).

1.5 Proteīnu mikročipu tehnoloģija

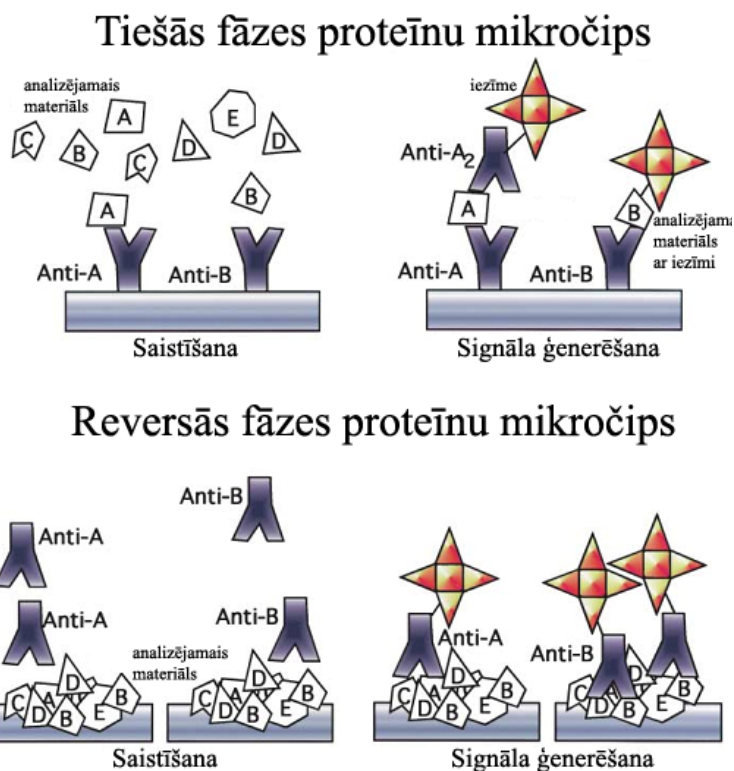
Fundamentālā līmenī proteīnu mikročips ir proteīnu punktu matrica, kas imobilizēta uz cieta nesēja. Katrs punkts var saturēt homogēnu vai heterogēnu „ēsmas” molekulu komplektu, piemēram, antivielas, šūnu lizātu, rekombinātus proteīnus vai peptīdus, medikamentus u.tml. Šāds mikročips var tikt inkubēts ar zondi (iezīmētu antivielu vai ligandu) vai nezināmu bioloģisku paraugu (šūnu lizāts, serums), kas potenciāli satur „mērķa” molekulas ar afinitāti pret mikročipa punktos imobilizētajām „ēsmas” molekulām. Specifiski

iezīmējot punktos saistītās „mērķa” molekulas, iespējams iegūt pozitīvu un negatīvu punktu rakstu, kur katra punkta dotā signāla intensitāte ir tieši proporcionāla „ēsmas” un „mērķa” molekulu kompleksu daudzumam attiecīgajā punktā. Šāda sistēma ir ļoti ērta, ja

nepieciešams analizēt lielu paraugu skaitu. Proteīnu mikročipu tehnoloģijām ir plašs pielietojums proteomikas pētījumos dažādu kvantitatīvu analīžu veikšanā, posttranslācijas modifikāciju pētījumos, kā arī klīniskos izmēģinājumos, piemēram, biopsijas paraugu analīzē (Liotta et.al. 2003).

Izšķir divas galvenās proteīnu mikročipu klases (7. attēls) – tiešās fāzes mikročipus (FPA), kas ļauj analizēt „mērķa” molekulu profilu vienā paraugā un reversās fāzes mikročipus (RPA), kas sniedz iespēju salīdzināt viena konkrēta proteīna saturu daudzos paraugos: (Liotta et.al. 2003).

- FPA gadījumā uz čipa tiek printētas daudzas atšķirīgas „ēsmas” molekulas (piemēram, antivielas), kuru uzdevums ir specifiski saistīt kādu konkrētu proteīnu no analizējamā parauga. Katrs šāds čips tiek inkubēts ar vienu testa



7. attēls. Tiešās un reversās fāzes mikročipu salīdzinājums (Liotta et.al. 2003).

Figure 7. Comparison of FPA and RPA.

paraugu (piemēram, šūnu lizātu). Saistītie proteīni tiek detektēti ar iezīmētu antivielu vai iezīmējot tos tiešā veidā.

- Turpretī uz reversās fāzes čipiem tiek printēti paši analizējamie paraugi. Šādi čipi var saturēt simtiem dažādu pacientu paraugu vai šūnu lizātu. Čipi tiek testēti, apstrādājot tos ar ligandu pret kādu paraugos potenciāli esošu proteīnu.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Materiāli

2.1.1 Reaktīvi un izejvielas

Ražotājs	Reaktīvi un izejvielas
Ambion Inc. (Applied Biosystems kopš 2006. gada)	Amonija acetāts
ASLA biotech Ltd., Latvija	HRV 3C proteāze
AMRESCO, Lietuva	Tris bāze (2-amino-2-hidroksimetil-propān-1,3-diols)
Bio-Rad, Inc.	APS (amonija persulfāts); akrilamīds; TEMED (tetrametiletilēndiamīns)
GE Healthcare, Lielbritānija	Amersham Hyperfilm TM ECL rentgenfilma
Fermentas, Lietuva	100bp+ Leader DNS garuma marķieris; 6x DNA Loading Dye Solution; IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozīds); 10x Tango TM buferis; 10x R buferis; 10x O buferis; 10x <i>Eco</i> RI buferis; TOPvision TM LE-GQ agaroze; garneļu sārmainā fosfatāze (SAP); Taq DNS polimerāze; DNaseI; DNase I buferis; RNase A; Proteināze K; <i>Hind</i> III restrikcijas endonukleāze; <i>Not</i> I restrikcijas endonukleāze; <i>Eco</i> RI restrikcijas endonukleāze; <i>Sal</i> I restrikcijas endonukleāze; PageRuler TM Prestained Protein Ladder proteīnu molekulas marķieris; PageRuler TM Unstained Protein Ladder proteīnu molekulas marķieris; High Fidelity PCR enzīmu maisījums; 10x High Fidelity PCR buferis ar 15mM MgCl ₂
IBA GmbH, Vācija	StrepMAB Classic antiiviela; StrepMAB Immo antiiviela; Strep-Tactin [®] Spin kolonnas
Invitrogen, ASV	LB pulveris (LB BROTH BASE); etīdija bromīds (10mg/ml)
Jackson ImmunoResearch Inc.	Cy3 iezīmēta kazas anti-peles IgG; Cy5 iezīmēta kazas anti-cilvēka IgG
Jaunpagasts Plus, SIA, Latvija	Etanols
Kodak, ASV	Dental Readymatic attīstītājs; Dental Readymatic fiksāža
MERCK (EMD)	Anti T7 tail fiber antiiviela; Borskābe; EDTA (etilēn-diamīn-tetraacetāts); hlороforms; karbenicilīns; T4 polinukleotīd kināze; glicerīns; glicīns; SDS
Premier Brands Ltd., Lielbritānija	Marvel beztauku piena pulveris
SIGMA, ASV	Anti-peles IgG (F _c specifiska); Tween 20 deterģents; MgCl ₂ ; PEG-8000 (polietilēn glikols 8000); Fenols:Hlorоforms:IAA (25:24:1); glikoze; ponso krāsviela
STANLAB, Polija	NaCl
Whatman Ltd., Lielbritānija	16 nitrocelulozes lauiņu FAST slaidi; filtrpapīrs; Protean nitrocelulozes membrāna
Реахим-Самара, Krievija	butanols

2.1.2 Reaģentu un izejvielu komplekti

Ražotājs	Komplekts
Applied Biosystems, ASV	BigDye Terminator cikliskās sekvenēšanas reaģentu komplekts
Fermentas, Lietuva	PCR reaģentu komplekts
GE Healthcare, Lielbritānija	ECL Plus Western Blotting detekcijas reaģentu komplekts; illustra GFX, PCR, DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplekts
MBiotech, Dienvidkoreja	SpinClean TM PCR attīrīšanas reaģentu komplekts
MERCK (EMD)	Novagen [®] T7 Select klonēšanas reaģentu komplekts; Novagen [®] DNS liģēšanas reaģentu komplekts; Novagen [®] T7 Select pakošanas reaģentu komplekts;
Metabion GmbH, Vācija	mi-PCR attīrīšanas reaģentu komplekts

2.1.3 Sintētiskie oligonukleotīdi

Nosaukums	Sekvence	Izcelsme
3C-site-F	5'-Phos-GATCCACTGGAGGTGCTGTTCCAGGGTCCG-3'	METABION, Vācija
3C-site-R	5'-Phos-AATTCGGACCCTGGAACAGCACCTCCAGTG-3'	METABION, Vācija
CSAG2-F (Sall)	5'-ATTGTCGACGAAGGTGTTAAGAGAAAAGA-3'	METABION, Vācija
CSAG2-R (HindIII)	5'-ATTAAGCTTTCTTGGGAACCTTGATAGG-3'	METABION, Vācija
CXorf48-F (Sall)	5'-ATTGTCGACCTCAGGCTTCTGAGACTTGC-3'	METABION, Vācija
CXorf48-R (HindIII)	5'-ATTAAGCTTAATAGTATAATCTATCACC-3'	METABION, Vācija
DDX53-Cter-F (Sall)	5'-ATTGTCGACATGTCACCCAACGACAAAG-3'	METABION, Vācija
DDX53-Cter-R (HindIII)	5'-ATTAAGCTTTCTTGATCGTGTCTCTGTGC-3'	METABION, Vācija
DDX53-Nter-F (Sall)	5'-ATTGTCGACGGCTGGAGTGGCCCCCTTCG-3'	METABION, Vācija
DDX53-Nter-R (HindIII)	5'-ATTAAGCTTACTTTTCAAGTCATCACACG-3'	METABION, Vācija
GAGE-F (EcoRI)	5'-ATTGAATTCTATGAGTTGGCGAGGAAGATC-3'	METABION, Vācija
GAGE-R (HindIII)	5'-TTAAGCTTTTCTTCAGGCGTTTTACC-3'	METABION, Vācija
HORMAD1-F (Sall)	5'-ATTGTCGACGCAGTTTCAGTATCCTGTATC-3'	METABION, Vācija
HORMAD1-R (HindIII)	5'-ATTAAGCTTAAGATCTGGACTTTCTTTAGAC-3'	METABION, Vācija
MAGEA-Nter-F (EcoRI)	5'-ATTGAATTCTATGCCTCTTGAGCAGAGG-3'	METABION, Vācija
MAGEA-Nter-R (HindIII)	5'-TTAAGCTTCAGCATTTCTGCTTTGTG-3'	METABION, Vācija
NY-ESO1-Nter-F (EcoRI)	5'-ATTGAATTCTGCCATGCAGGCCGAAGGC-3'	METABION, Vācija
NY-ESO1-Nter-R (HindIII)	5'-TTAAGCTTCAGCTCTGCTTCCATGG-3'	METABION, Vācija
PAGE2/2B-R (HindIII)	5'-ATTAAGCTTTTCCATGTCAGGCCCTTGAAAAGC-3'	METABION, Vācija
PAGE2B-F (Sall)	5'-ATTGTCGACAATATGAGTGAGCATGTGAGAAC -3'	METABION, Vācija
PAGE2-F (Sall)	5'-ATTGTCGACAATATGAGTGAGCTTCTAAGAGC-3'	METABION, Vācija
PRKACA-Cter-F (Sall)	5'-ATTGTCGACGTTCTTATCTATGAAATGG-3'	METABION, Vācija
PRKACA-Cter-R (HindIII)	5'-AATAAGCTTGATTTCTTCTTCCTCATAGTC-3'	METABION, Vācija
PRKACA-Nter-F (Sall)	5'-ATTGTCGACGGCAGCGAGCAGGAGAGC-3'	METABION, Vācija
PRKACA-Nter-R (HindIII)	5'-ATTAAGCTTGTATAAGTTTGAGTTGTCC-3'	METABION, Vācija
T7 Down	5'-AACCCCTCAAGACCCGTTTA-3'	METABION, Vācija
T7 Up2	5'-CTTCGCCCAGAAGCTGCA-3'	METABION, Vācija

2.1.4 Bufēršķīdumi

Bufēršķīdums	Sastāvs
10x M9 sāļi	<ol style="list-style-type: none"> 1) 420mM Na₂HPO₄ 2) 240mM KH₂PO₄ 3) 90mM NaCl 4) 190mM NH₄Cl
10x TBE buferis	<ol style="list-style-type: none"> 1) 0,89M Tris bāze 2) 0,89M H₃BO₃ (pH 8,3) 3) 20mM EDTA
10x TBS buferis	<ol style="list-style-type: none"> 1) 1,35M NaCl 2) 0,25M Tris bāze 3) 0,25M Tris-HCl (pH 7,4)
2,5x sekvenēšanas buferis	<ol style="list-style-type: none"> 1) 200mM Tris bāze 2) 5mM MgCl₂
Buferis TE	<ol style="list-style-type: none"> 1) 10mM Tris-HCl (pH 7,5) 2) 1mM EDTA
Precipitācijas šķīdums	<ol style="list-style-type: none"> 1) 10mM CH₃COONa (pH 4,6-5,2) 2) 77% etanols

10x SDS-PAG elektroforēzes buferis	1) 250mM Tris bāze 2) 1,92M Glicīns 3) 1% SDS
10x Pārneses buferis	1) 250mM Tris bāze 2) 1,92M Glicīns
1x Pārneses buferis	Lai pagatavotu 1 litru: 1) 200ml metanols 2) 100ml 10x Transfer buferis 3) 700ml ūdens
HRV 3C proteāzes buferis	Lai pagatavotu 1ml: 1) 908μl ūdens 2) 50μl 1M Tris-HCl, pH7,0 3) 30μl 5M NaCl 4) 2μl 0,5M EDTA 5) 10μl 100mM DTT
4x Tris/SDS pH8,8 buferis	1) 1,5M Tris bāze 2) 0,4% SDS 3) HCl līdz pH8,8
4x Tris/SDS pH6,8 buferis	1) 0,5M Tris bāze 2) 0,4% SDS 3) HCl līdz pH6,8
4x Laemmli paraugu buferis	1) 1ml glicerīns 2) 3ml 10% SDS 3) 1,25ml 4x Upper tris/SDS buferis 4) 0,21ml 1% bromfenolzilais
Fāgu ekstrakcijas buferis (PEB)	1) 100mM NaCl 2) 20mM Tris-HCl, pH8,0 3) 6mM MgSO ₄

2.1.5. Barotnes

Barotne	Sastāvs
LB barotne	1) 2% LB pulveris 2) 98% ūdens
LB Top agars	1) 2% LB pulveris 2) 0,6% agaroze 3) 97,4% ūdens

2.1.6. Baktēriju celmi un vektori

Nosaukums	Izcelsme
Novagen [®] BLT-5615 Glycerol Stock T7-SIIT1 vektors	MERCK (EMD) Konstruēts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra vēža molekulārās ģenētikas laboratorijā uz komerciāli pieejama T7Select10-3b vektora (MERCK) bāzes.

2.1.7. Serumi

Serumu paraugi ņemti no Vācijas Vēža izpētes centra, kur tie ievākti no II-IV stadijas melanomas pacientiem, kā arī no Latvijas Onkoloģijas centra. Visi pacienti, no kuriem ievāks serums, iepriekš informēti par pētījuma mērķiem, norisi un iespējamajiem riskiem, kā arī devuši rakstisku piekrišanu saskaņā ar lokālo ētikas komisiju noteikumiem. Atļauju pētījumiem devusi LR Centrālā Medicīnas ētikas komisija.

2.1.8. Aparatūra un aprīkojums

Apraksts	Modelis	Ražotājs
Aukstuma bloks	PCR-cooler	Eppendorf, Vācija
Automātiskais sekvenātors	ABI PRISM 3100	Applied Biosystems, ASV
Autoradiogrāfijas kasete	Amersham Hypercassette TM	GE Healthcare, Lielbritānija
Centrifūga	5415D	Eppendorf, Vācija
Centrifūga	J-21C ar JA-10 rotoru	Beckman Coulter, Inc.
Čipu kasete	FAST [®] Frame	Whatman Ltd., Lielbritānija
Čipu printeris	QArray Mini microarrayer	Genetix Ltd., Lielbritānija
Čipu skaneris	AQuire	Genetix Ltd., Lielbritānija
DNS amplifikātors	GeneAmp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems, ASV
Horizontālās elektroforēzes vanna	GNA-100	Pharmacia, Zviedrija
Inkubators	INFORS AG CH-4103	Novatron, Inc.
Kelvinātors	MDF-U53V	SANYO Electric Co., Ltd.
Kratītājs	HOT-SHAKER	SCIERA
Kratītājs	Orbital Shaker OS-20	Biosan Laboratories, Inc
Laminārs	DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR	Biosan Laboratories, Inc.
Līdzstrāvas barošanas bloks	PowerPac Basic	Bio-Rad, Inc.
Magnētiskais maisītājs	MAGNETIC LABMIXER	LABOTEK, Latvija
Maisītājs	Bio -Vortex V1	Biosan Laboratories, Inc.
Maisītājs	Elmi Intelli-Mixer RM-2	Rose Scientific Ltd., Kanāda
Mikroviļņu krāsns	M1712NR	Samsung, Dienvidkoreja
pH-metrs	pH 510	Oakton Instruments, ASV
Spektrofotometrs	NanoDrop [®] ND-1000	Thermo Scientific, ASV
Svari	PLS 360-3 (360+/-0,001g)	KERN, Vācija
Termobloks	TDB-120	Biosan Laboratories, Inc.
Termostats	LKB Bromma 2219	Pharmacia
UV transiluminators	UVT-20M/W	Herolab, Vācija
Vertikālās elektroforēzes vanna	Mini-Protean TetraCell	Bio-Rad, Inc.

2.2. Metodes

2.2.1. 3C saita oligonukleotīdu hibridizēšana

1. Liofilizētus oligonukleotīdus suspendē ūdenī līdz koncentrācijai 100pmol/ μ l, uzglabā pie -20°C :
 - 22,2nmol 3C-Site-F (5'-Phos-GATCCACTGGAGGTGCTGTTCCAGGGTCCG-3') + 222 μ l ūdens
 - 26,1nmol 3C-Site-R (5'-Phos-AATTCGGACCCTGGAACAGCACCTCCAGTG-3') + 261 μ l ūdens
2. Sagatavo reakcijas maisījumu oligonukleotīdu hibridizācijai:
 - 1 μ l 3C-Site-F (100pmol/ μ l)
 - 1 μ l 3C-Site-R (100pmol/ μ l)
 - 5 μ l TE bufera
3. Denaturē sekundārās struktūras, karsējot reakcijas maisījumu 5 minūtes pie 95°C .
4. Hibridizē oligonukleotīdus, reakcijas maisījumu 15 minūtes inkubējot istabas temperatūrā, uzglabā pie -20°C .
5. Pārbauda hibridizācijas rezultātus, veicot elektroforēzi uz 2% agarozes gēla.

2.2.2. T7-SIIT1 vektora dubulta šķelšana pa *Bam*HI un *Eco*RI restrikcijas saitēm

1. Šķeļ T7-SIIT1 vektoru pa *Bam*HI un *Eco*RI saitēm:
 - Sagatavo reakcijas maisījumu:
 - 7 μ l SIIT1/T7 vektora (100ng/ μ l)
 - 4 μ l 10x TangoTM bufera
 - 0,5 μ l *Bam*HI restrikcijas endonukleāze (10U/ μ l)
 - 0,5 μ l *Eco*RI restrikcijas endonukleāze (10U/ μ l)
 - 8 μ l ūdens
 - Inkubē 3h pie 37°C
2. Pievieno 1 μ l SAP (1U/ μ l), kas katalizē 3' un 5' fosfātgrupu atbrīvošanu no DNS molekulas. Inkubē 30 minūtes pie 37°C inkubē 30 minūtes pie 37°C
3. Inaktivē SAP, karsējot 15 minūtes pie 80°C
4. Fenolē
5. Hloroformē

6. Pievieno reakcijas maisījumam:
 - 1µl glikoigēna (10mg/ml)
 - 100µl 5M amonija acetāta
 - 500µl 96% etanola
7. Precipitē 1h pie -70°C
8. Centrifugē 15 minūtes pie 4°C un maksimāla g
9. Skalo 2x ar 1ml 70% etanolu
10. Nogulsni suspendē 5µl TE bufera, uzglabā pie 4°C

2.2.3. 3C proteāzes saita ligēšana T7-SIIT1 vektorā

1. Sagatavo ligēšanas reakcijas maisījumu:
 - 0,5µl 10x ligēšanas buferis
 - 0,5µl 10mM ATP
 - 0,5µl 100mM DTT
 - 0,5µl 4U/µl T4 DNS ligāze
 - 2µl T7-SIIT1 vektors (šķelts pa *Bam*HI un *Eco*RI)
 - 1µl ds 3C saita oligonukleotīds (14,3pmol/µl)
2. Samaisa pipetējot un ligē 14h pie 16°C.
3. Uzglabā pie 4°C.

2.2.4. Rekombinanto T7 fāgu pakošana

1. Uz ledus bloka atkausē T7 pakošanas ekstraktu (T7Select[®] Packaging Extract)
2. 25µl T7 pakošanas ekstrakta tilpumam (25µl pakojums var tikt sadalīts mazākos reakcijas tilpumos, šādā gadījumā jālieto arī proporcionāli mazāki pārējo reaģentu tilpumi) pievieno 5µl ligēšanas reakcijas vai 0,5µg kontroles DNS. Maisa pipetējot (nevorteksēt!).
3. Inkubē reakciju istabas temperatūrā (22°C) 2 stundas.
4. Pārtrauc reakciju, pievienojot 270µl sterila LB. Ja reakciju paredzēts uzglabāt ilgāk par 24h, pievieno 20µl hloroforma un samaisa invertējot. Uzglabā pie 4°C līdz 1 nedēļai bez būtiskiem titra zudumiem.

2.2.5. Rekombinanto fāgu titrēšana

1. Sagatavo *E.coli* šūnas titrēšanai. Laminārās plūsmas boksā pagatavo sekojošu maisījumu:
 - 10ml LB barotne

- 1ml 10x M9 sāļi
- 100µl 40% glikoze
- 10µl 1M MgSO₄
- 10µl karbemicīna (100µg/ml)
- 100µl *E.coli* BLT-5615 naktskultūras

Inkubē 2h kratītājā (160RMP) pie 37°C. Pievieno 1/1000 tilpuma IPTG. Turpina inkubāciju vēl 30 minūtes. Uzglabā pie 4°C līdz 48 stundām.

2. Izkausē LB TOP agaru, iepilda stobriņos (materiālu daudzumi doti 1. tabulā) un ievieto termostatā pie 50°C.

1. tabula.

Izejvielu daudzumi atkarībā no izmantotajām platītēm

Table 1

Amounts of ingredients depending of used plates

Platīte	Top agars	BLT-5615 kultūra (OD ₆₀₀ ≈1.0)	Karbemicīns, 100µg/ml	IPTG, 1M
60mm	1,5 ml	100 µl	1,5 µl	1,5 µl
100mm	3,0 ml	250 µl	3,0 µl	3,0 µl
150mm	10,0 ml	800 µl	10,0 µl	10,0 µl
10x10cm	5,0 ml	450 µl	5,0 µl	5,0 µl

3. Pagatavo fāgu atšķaidījumu sēriju fāgu ekstrakcijas buferī (1/10⁰-1/10⁴ – rekombinantam fāgam un līdz 1/10⁵, ja izmantota T7 pakošanas kontroles DNS (T7Select® Packaging Control DNA).
4. 1µl no katra atšķaidījuma pievieno *E.coli* BLT-5615 kultūrai, maisījumu pievieno pie izkausētā LB TOP agara. Pievieno karbemicīnu un IPTG, invertē, uzlej uz sasildītas platītes ar LB TOP agaru un atstāj līdz sacietē. Inkubē termostatā pie 37°C 1-1,5h līdz skaidri saskatāmi plaki.
5. Saskaīta plakus un aprēķina bibliotēkas titru pēc formulas: $n_0 = n \cdot x \cdot V_0$, kur n_0 – bibliotēkas kopējais apjoms, n – plaku skaits uz platītes, x – atšķaidījuma reižu skaits, V_0 – bibliotēkas kopējais tilpums (µl).

2.2.6. Fāgu izolēšana

1. Izmantojot pipeti, no Petri plates izolē atsevišķus plakus.
2. Katru plaku suspendē 100µl fāgu ekstrakcijas bufera. Vorteksē. Centrifugē, lai savāktu suspensiju stobriņa apakšā.
3. Uzglabā pie 4°C.

2.2.7. T7 polilinkera rajona PCR amplificēšana

PCR jeb polimerāzes ķēdes reakcija ir *in vitro* DNS amplificēšanas metode, kas balstās uz DNS polimerāzes darbību. PCR reakcijā parasti tiek lietota termoizturīga DNS polimerāze, piemēram, *Taq* polimerāze, kas izolēta no termoizturīgas *Thermus aquaticus* baktērijas, ļaujot automatizēt PCR reakciju, jo pēc katra cikla vairs nav jāpievieno jauna DNS polimerāze. Tā kā DNS polimerāze nespēj sintezēt jaunu DNS ķēdi, bet tikai pagarināt esošo, PCR reakcijā tiek izmantoti DNS praimerī – īsi oligonukleotīdi, kas ir komplementāri kādam amplificējamās DNS reģionam. T7 vektora polilinkera rajona PCR amplificēšanu veic sekojoši:

1. Sagatavo PCR reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 20µl (uz aukstuma bloka):

- 2µl 10x PCR bufera
- 2µl 25mM MgCl₂
- 2µl 2mM dNTPs
- 11,85µl. ūdens
- 0,15µl 5U/µl *Taq* DNS polimerāze
- 0,5µl 10pmol/l T7 Up2 praimera
- 0,5µl 10pmol/l T7 Down praimera
- 1µl T7 fāga suspensijas

2. Amplificē DNS, veicot PCR sekojošos apstākļos:

	Temperatūra	Ilgums	
Sākotnējā DNS denaturācija	94°C	4 min	
DNS denaturācija	94°C	30 s	35 cikli
Praimeru hibridizācija	50°C	30 s	
DNS sintēze	72°C	45 s	
Noslēdzošā fāze	72°C	10 min	
Uzglabāšana	4°C	∞	

3. Veic PCR produkta attīrīšanu ar Metabion PCR attīrīšanas reaģentu komplektu atbilstoši ražotāja protokolam, eluē DNS 50µl dH₂O un nomēra koncentrāciju ar NanoDrop® ND-1000 spektrofotometru.

2.2.8. DNS elektroforēze agarozes gēlā

Lai raksturotu DNS garumu, tīrības pakāpi vai arī izdalītu noteikta garuma DNS frakciju, veic elektroforēzi, kura balstās uz DNS molekulas spēju pārvietoties elektriskajā laukā. Lai ierobežotu molekulas kustību atkarībā no tās izmēra, izmanto nesējus. DNS elektroforēzi visbiežāk veic 0,6-2,0% agarozes gēlā. Tā kā, palielinot agarozes koncentrāciju,

samazinās poru izmērs agarozes gēlā, gēla koncentrāciju izvēlas atbilstoši analizējamās DNS garumam (2. tabula).

2.tabula

Agarozes gēla koncentrācijas izvēle atkarībā no analizējamās DNS garuma

Table 2

Concentrations of the agarose gel depending of analysable DNA's length

DNS garums, kb	0,1-3,0	0,2-4,0	0,4-6,0	0,5-7,0	0,8-10	1,0-20
Agarozs, %	2,0	1,5	1,2	0,9	0,7	0,6

Ja DNS garums ir mazāks par 0,1kb, kā nesēju izmanto poliakrilamīda gēlu, savukārt, ja DNS garums pārsniedz 20kb, izmanto pulsējošā lauka elektroforēzi mainīga virziena elektriskajā laukā, jo DNS fragmenti, kas pārsniedz 23kb, nemainīga virziena elektriskajā laukā kustas ar vienādu ātrumu, savukārt pulsējošā laukā, pateicoties DNS molekulas orientācijas maiņai, iespējams analizēt līdz pat 10Mb garus DNS fragmentus.

DNS elektroforēzi veic sekojoši:

1. Pagatavo nepieciešamās koncentrācijas agarozes šķīdumu atbilstoši analizējamās DNS garumam (2. tabula).
 - Nosver nepieciešamo daudzumu agarozes, izšķīdina 0,5x TBE buferī, karsējot mikroviļņu krāsnī.
 - Pievieno 10mg/ml etīdija bromīdu (1µl uz 100ml agarozes gēla), kas spēj saistīties pie dubultspiralizētas DNS un ir fluorescenti detektējams.
2. Šķīdumu atdzesē līdz aptuveni 60°C un iepilda elektroforēzes kariatē tā, lai ķemmītes zari iespiestos aptuveni 2-3mm dziļi gēlā. Karieti atstāj nekustīgu, līdz agarozes šķīdums pāriet gēla stāvoklī.
3. Elektroforēzes vanniņu uzpilda ar 0,5x TBE bufera ar aprēķinu, lai tas nedaudz pārsegtu agarozes gēlu. No elektroforēzes kariatē izņem ķemmīti un karieti ar gēlu ievieto elektroforēzes vanniņā.
4. Sagatavo DNS paraugus uznešanai uz gēla.
 - 2µl DNS suspensijai pievieno 1µl 2x uznešanas krāsas šķīduma (Loading Dye Solution).
5. DNS paraugus ienes bedrītēs uz agarozes gēla. Vanniņu pieslēdz pie līdzstrāvas barošanas bloka (100V) un atstāj uz aptuveni 40 minūtēm (atkarībā no DNS garuma)
6. Agarozes gēlu izņem no elektroforēzes kariatē un aplūko UV transiluminatorā.

2.2.9. T7 polilinkera rajona DNS krāsas-terminatora sekvenēšana

Krāsas-terminatora sekvenēšana ir klasiskās Sangeras jeb ķēdes-terminācijas metodes modifikācija, kas, pateicoties ar augstas jutības pie atšķirīgiem viļņa garumiem fluorescentām

krāsvielām iezīmētiem terminējošiem didezoksiribonukleotīdiem, ļauj veikt visu četru nukleotīdu sekvenēšanu vienā reakcijā. Sekvenēšanas reakcijai izmanto jau gatavu BigDye® maisījumu, kas satur fluorescenti iezīmētus terminējošos ddNTPs, dNTPs un termiski izturīgu AmpliTaq® DNS polimerāzi. Sekvenēšanu veic pēc sekojošas shēmas:

1. Ar Metabion PCR attīrīšanas reaģentu komplektu attīrītai DNS nomēra koncentrāciju. DNS daudzumu sekvenēšanas reakcijai izvēlas atkarībā no sekvenējamās DNS garuma (3. tabula), ko nosaka, veicot DNS elektroforēzi.

3. tabula

DNS daudzuma izvēle sekvenēšanai

Table 3

Selection of DNA quantity for sequencing

DNS garums, bp	100-200	200-500	500-1000	1000-2000	>2000	pDNS
DNS sekvenēšanai, ng	1-3	3-10	5-20	10-40	40-100	200-500

2. Sagatavo reakcijas maisījumu ar kopējo tilpumu 10µl (uz aukstuma bloka):

- x µl DNS paraugs
- y µl ūdens
- 3µl 2,5x sekvenēšanas buferis
- 1µl 2,5pmol/µl T7 Up2 (vai 2,5pmol/µl T7 Down) praimeris
- 1µl BigDye®

3. Amplificē DNS, veicot PCR sekojošos apstākļos:

	Temperatūra	Ilgums	
Sākotnējā DNS denaturācija	94°C	3 min	
DNS denaturācija	94°C	30 s	
Praimeru hibridizācija	57°C	15 s	25 cikli
DNS sintēze	60°C	4 min	
Noslēdzošā fāze	60°C	10 min	
Uzglabāšana	4°C	∞	

4. Veic sekvenēšanas reakcijas attīrīšanu:

- 10µl sekvenēšanas reakcijas maisījumam pievieno 130µl precipitācijas šķīduma, pārnes 1,5ml stobriņā, savorteksē.
- Precipitē DNS 15 minūtes pie 4°C.
- Centrifugē 10 minūtes pie 13,2 kRMP 4°C temperatūrā, aizvāc supernatantu.
- Pievieno 1ml 70-75% etanolu, invertē, centrifugē 5 minūtes pie 13,2 kRMP istabas temperatūrā, aizvāc supernatantu.
- Atkārti iepriekšējo darbību.

- Centrifugē, lai savāktu atlikušo supernatantu stobriņa apakšā, aizvāc to ar mikropipeti.
 - Stobriņus žāvē atvērtā veidā, līdz tie pilnībā izžuvuši.
5. Veic kapilāro elektroforēzi un sekvenču nolasīšanu ar ABI Prism Genetic Analyzer 3100.
6. Veic sekvenču analīzi ar Contig Express datorprogrammu.

2.2.10. Fāgu amplificēšana

1. Uzaudzē *E.coli* BLT-5615 šūnas:
 - Sagatavo sekojošu maisījumu:
 - 100ml LB
 - 10ml 10x M9 sāļi
 - 1ml 40% glikoze
 - 100µl 1M MgSO₄
 - 1,1ml BLT-5615 ON kultūra
 - 2,5h inkubē uz kratītāja pie 37°C, 200RMP
 - Pievieno 112µl 1M IPTG
 - Turpina inkubēt 30 minūtes pie 37°C, 200RMP
2. 5ml šūnas inficē ar 50µl zema titra T7-SIIT1-3C. Inkubē aptuveni 1,5h pie 37°C, 200RMP, līdz šūnas tiek lizētas. Centrifugē 10 minūtes pie 3,7kRMP. 3x1ml supernatantam ar augsta titra T7-SIIT1-3C pievieno 0,1 tilpumu 80% glicerīna uzglabā kelvinatorā pie -80°C, pārējo – pie 4°C tūlītējai lietošanai.
3. 100ml BLT-5615 kultūras inficē ar 20µl augsta titra T7-SIIT1-3C. Inkubē aptuveni 2h pie 37°C, 200RMP, līdz šūnas tiek lizētas. Pievieno 20µl DNaseI, turpina inkubēt vēl 15 minūtes.
4. Pievieno 2,5g NaCl (izšķīdina, izmantojot magnētisko maisītāju). Centrifugē 10 minūtes pie 8kRMP, 4°C. Pievieno supernatantam 10g PEG-8000, šķīdina uz magnētiskā maisītāja. Atstāj uz nakti precipitēties pie 4°C.
5. Centrifugē 10 minūtes pie 7800 kRMP. Aizvāc supernatantu, izžāvē nogulsni, resuspendē 3ml PEB.

2.2.11. Fāgu DNS izdalīšana

1. T7-SIIT1-3C vektora DNS suspensijai pievieno 10µl DNaseI un 30µl DNaseI buferi (ar Mg²⁺). Inkubē 1h pie 37°C.

2. Inaktivē DNaseI un izjauc fāga daļiņas, pievienojot 0,15ml 0,5M EDTA (pH 8,0) un 0,15ml 10% SDS. 10 minūtes maisa invertējot.
3. Fenolē. Atkārti fenolēšanu, līdz interfāzē nav redzamas nogulsnes.
4. Hloroformē.
5. Pievieno 2 tilpumus 96% etanola ūdens fāzei. Atstāj uz nakti precipitēties pie -20°C.
6. Centrifugē 30 minūtes pie 12kRMP, 10°C.
7. Skalo nogulsni 1x ar 75% etanolu un 1x ar 96% etanolu.
8. Nožāvē nogulsni, šķīdina 600µl TE buferī.
9. Pievieno 10µl RNaseA, inkubē 2h pie 37°C.
10. Pievieno 10ml proteināzi K (21,4 mg/ml), inkubē 2h pie 37°C, atdzesē līdz istabas temperatūrai.
11. Fenolē (2x).
12. Hloroformē (2x).
13. Pievieno 2,5 tilpumus 96% etanola un 0,5 tilpumus 3M CH₃COONa (pH5). Precipitē 20 minūtes pie -70°C.
14. Centrifugē 15 minūtes pie maksimāla g, 10°C. Aizvāc supernatantu. Nogulsni 2x skalo ar 75% etanolu, izžāvē, suspendē 400µl TE buferī. Nomēra DNS koncentrāciju, izmantojot NanoDrop spektrofotometru.

2.2.12. T7-SIIT1-3C vektora DNS šķelšana pa *Hind*III un *Sal*I / *Eco*RI restrikcijas saitēm

1. Sagatavo reakcijas maisījumu T7-SIIT1-3C vektora DNS šķelšanai pa *Sal*I vai *Eco*RI saitēm:
 - 6,8µl 1477ng/µl T7-SIIT1-3C vektora DNS (2.2.11.)
 - 15µl 10x O buferis (šķelšanai ar *Sal*I) vai 15µl 10x *Eco*RI buferis (šķelšanai ar *Eco*RI)
 - 30µl 10U/µl *Sal*I vai 30µl 10U/µl *Eco*RI restrikcijas endonukleāze
 - 98,2µl ūdens
2. Šķeļ 16h pie 37°C.
3. Pievieno 0,1 tilpumu 5M NaCl un 3 tilpumus 96% etanola, precipitē 30 minūtes pie -20 °C, centrifugē 20 minūtes pie 4 °C un maksimāla g, aizvāc supernatantu.
4. Skalo nogulsni ar 70% etanolu (2x), resuspendē 10µl ūdens.

5. Pievieno:
 - 15µl 10x R buferi
 - 30µl 10U/µl *HindIII* restrikcijas endonukleāzi
 - 95µl ūdens
6. Šķeļ 16h pie 37°C.
7. Pievieno 15µl 1U/µl garneļu sārmaino fosfatāzi (SAP), kas katalizē 3' un 5' fosfātgrupu atbrīvošanu no DNS molekulas. Inkubē 30 minūtes pie 37°C.
8. Karsē 15 minūtes uz termobloka pie 80°C, lai inaktivētu SAP.
9. Fenolē (2x)
10. Hloroformē
11. Pievieno 0,1 tilpumu 5M NaCl un 3 tilpumus 96% etanola, precipitē 30 minūtes pie -20 °C, centrifugē 20 minūtes pie 4 °C un maksimāla g, aizvāc supernatantu.
12. Skalo nogulsni ar 70% etanolu (2x), resuspendē 11µl TE bufera. Nomēra DNS koncentrāciju, izmantojot NanoDrop spektrofotometru.

2.2.13. Audzēja antigēnu DNS PCR amplificēšana

1. Sagatavo PCR reakcijas maisījumu:
 - 4µl 10x High Fidelity PCR buferis
 - 4µl 25mM MgCl₂
 - 4µl. 2mM dNTPs
 - 24µl ūdens
 - 1µl 10µM F-praimeris ar *EcoRI* (MAGEA, GAGE un NY-ESO1 antigēniem) vai *SalI* (pārējiem antigēniem) šķelšanas saitu
 - 1µl 10µM R-praimeris ar *HindIII* šķelšanas saitu
 - 1µl neatšķaidītas sēklinieku kDNS vai monoklonālu bibliotēkas fāgu ar atbilstošu antigēna insertu.
2. Amplificē DNS, veicot PCR sekojošos apstākļos:

	Temperatūra	Ilgums	
Sākotnējā DNS denaturācija	94°C	4 min	
Pārtrauc reakciju, pievieno 1µl 3:10 atšķaidītu High Fidelity enzīmu maisījumu			
DNS denaturācija	94°C	45 s	
Praimeru hibridizācija	60°C	30 s	35 cikli
DNS sintēze	72°C	45 s	
Noslēdzošā fāze	72°C	7 min	
Uzglabāšana	4°C	∞	

2.2.14. PCR produktu DNS paš-ligēšana

Tā kā optimālai restrikcijas endonukleāžu darbībai parasti nepieciešams 5' pagarinājums aiz atpazīšanas saita, DNS šķelšanas efektivitātes palielināšanai jāveic šķeļamo fragmentu paš-ligēšana, jo izmantotajiem praimeriem 5' pagarinājums aiz restrikcijas saita ir tikai 3 nukleotīdi, kam atbilst, piemēram, 10%/2h un 75%/20h šķelšanas efektivitāte ar *HindIII* restrikcijas endonukleāzi.

1. Sagatavo reakcijas maisījumu 5' galu fosforilēšanai ar PNK:
 - 18,5µl PCR produkta (vidēji 20-40ng DNS/µl)
 - 2,5µl 10x ligēšanas bufera
 - 1µl 10U/µl PNK
2. Inkubē 30 minūtes uz termobloka pie 37°C
3. Pievieno 0,5µl 5U/µl T4 DNS ligāzi un 2,5µl 50% PEG-4000
4. Inkubē ligāzes reakciju 1h pie 22°C
5. Inaktivē ligāzi, karsējot 15 minūtes uz termobloka pie 65°C
6. Pārbauda, vai DNS fragmenti salīgējušies, veicot elektroforēzi 1,5% agarozes gēlā (2.2.8.). Veic DNS šķelšanu pa *HindIII* un *Sall* / *EcoRI* restrikcijas saitēm (2.2.15.).

2.2.15. Ligēto PCR produktu šķelšana pa *HindIII* un *Sall* / *EcoRI* restrikcijas saitēm

1. Attīra ligāzes reakciju (2.2.14.) ar MicroSpin kolonnu pēc ražotāja protokola.
2. 30µl paraugam pievieno 1µl 10U/µl *EcoRI* (MAGEA, GAGE un NY-ESO1 paraugiem) vai 1µl 10U/µl *Sall* (pārējiem paraugiem) restrikcijas endonukleāzi un attiecīgi 5µl 10x *EcoRI* vai O buferi.
3. Inkubē 1h pie 37°C.
4. Attīra reakciju ar illustra GFX, PCR, DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplektu pēc ražotāja protokola, eluē 44µl ūdens.
5. Pievieno 5µl 10x R buferi un 1µl 10U/µl *HindIII* restrikcijas endonukleāzi.
6. Inkubē 1h pie 37°C.
7. Attīra reakciju ar illustra GFX, PCR, DNS un gēla attīrīšanas reaģentu komplektu pēc ražotāja protokola, eluē 20µl ūdens. Nomēra koncentrāciju, izmantojot NanoDrop ND1000 spektrofotometru.

2.2.16. Antigēnu insertu ligēšana T7-SIIT1-3C vektorā

1. Sagatavo ligāzes reakcijas maisījumu:
 - 0,5µl 10x ligēšanas buferis
 - 0,5µl 10mM ATP

- 0,5µl 100mM DTT
 - 0,5µl 4U/µl T4 DNS ligāze
 - 1µl šķelts T7-SIIT1-3C vektors (2.2.12.)
 - a) Šķelts ar *HindIII*+*EcoRI*, 135ng/µl – MAGEA, GAGE un NY-ESO1 insertiem
 - b) Šķelts ar *HindIII*+*Sall*, 140ng/µl – pārējiem inertiem
 - 2µl antigēnu inserti (2.2.15.)
2. Liģē 14h pie 16°C
 3. Pako ar T7Select[®] pakošanas ekstraktu (2.2.4.), amplificē uz platītes *E. coli* BLT-5615 kultūrā (2.2.5.), izolē plakus (2.2.6.), amplificē (2.2.7.) un sekvencē (2.2.9.) polilinkera rajonu. Analizē sekvenses ar Contig Express datorprogrammu un izvēlas pareizi uzkonstruētos klonus, kurus tālāk amplificē (2.2.17.) 6ml BLT-5615 kultūras.

2.2.17. Audzēju antigēnus nesošo T7-SIIT1-3C vektoru amplificēšana

1. 5ml BLT-5615 kultūru (kā 2.2.10.) inficē ar 10µl augsta titra antigēnu nesošu T7-SIIT1-3C fāgu (2.2.16.); inkubē pie 37°C līdz šūnas tiek lizētas.
2. Centrifugē 10 minūtes pie 4 kRMP, supernatantu pārnes jaunā stobriņā.
3. Lizātam pievieno 1ml 20% PEG-8000 / 2,5M NaCl šķīduma, samaisa invertējot, atstāj līdz nākamajai dienai precipitēties pie 4°C
4. Sadala lizātu pa 2ml stobriņiem, centrifugē 10 minūtes pie 4°C un maksimāla g
5. Aizvāc supernatantu. Nogulsni suspendē 200µl 3C proteāzes bufera

2.2.18. Antigēnu atšķelšana ar 3C proteāzi no T7-SIIT1-3C vektoru apvalka 10B proteīna

1. 40µl fāga suspensijas (2.2.17.) pievieno 100µl 3C buferi un 10µl 4U/µl 3C proteāzi. Inkubē reakcijas maisījumu 16h pie 8°C uz maisītāja
2. Attīra StrepIIITag iezīmi saturošos nošķeltos antigēnu peptīdus ar StrepTactin Spin Column reģentu un izejvielu komplektu pēc ražotāja protokola. Eluē 80µl BE bufera.
3. Nomēra proteīnu koncentrāciju ar NanoDrop ND-1000 pektrofotometru. Veic nošķelto peptīdu imunoblotu (2.2.19.). Nošķeltos peptīdus izmanto proteīnu mikročipu izgatavošanai (2.2.20.).

2.2.19. Proteīnu imunoblots

1. Proteīnu paraugus fracionē pēc masas denaturējošā poliakrilamīda gēlā (SDS-PAGE)
 - 1) Stikla elektroforēzes karieti ievieto statīvā
 - 2) Sagatavo sekojošus gēlu maisījumus:

Apakšējais gēls (12%):

4ml 30% akrilamīds
2,5ml Tris/SDS pH8,8
3,4ml ūdens

Augšējais gēls (5%):

1,66ml 30% akrilamīds
2,5ml Tris/SDS pH6,8
5,75ml ūdens

- 3) 1ml apakšējā gēla maisījumam pievieno 10µl 10% amonija persulfāta (APS) un 2µl 6,6M TEMED. Uzpilda karieti līdz 1cm no apakšas (korķa gēls)
 - 4) Tiklīdz korķa gēls sapolimerizējies, atlikušajam apakšējā gēla maisījumam pievieno 80µl 10% APS un 10µl 6,6M TEMED un ienes karietē līdz 5mm atzīmei zem ķemmītes zaru līmeņa. Virs gēla uznes 200µl butanola, lai nodrošinātu bezskābekļa apstākļus gēla polimerizācijai. Pēc gēla polimerizācijas butanolu atsūc.
 - 5) Augšējā (koncentrējošā) gēla maisījumam pievieno 80µl 10% APS un 10µl 6,6M TEMED. Turot ķemmīti ieslīpi, lai starp tās zariem neveidotos gaisa burbuļi, uzpilda karieti līdz augšai ar augšējā gēla maisījumu. Ievieto ķemmīti tai paredzētajā pozīcijā un gaida līdz gēls sapolimerizējas.
 - 6) Ievieto karieti ar gēlu elektroforēzes kasetē, kuru, attiecīgi, ievieto elektroforēzes vannā. Uzpilda kaseti un vannu ar 1x SDS-PAG elektroforēzes buferi. Izņem ķemmīti no gēla. Izskalo bedrītes ar 1x Running buferi.
 - 7) 10µl analizējamiem proteīnu koloīdiem pievieno 4µl Laemmli paraugu bufera, vāra 5 minūtes pie 100°C. (Ja uz gēla tiek nests fāgs, to vispirms nokarsē 3 minūtes pie 100°C un apstrādā ar DNāzi).
 - 8) Analizējamus paraugus uznes uz gēla. Lai noteiktu proteīnu masu, uz gēla uznes arī sekojošus marķierus:
 - 5µl PageRuler prestained protein ladder
 - 3µl PageRuler unstained protein ladder (ar StrepTag iezīmi)
 - 9) Veic elektroforēzi pie 20mA apmēram 1h (līdz krāsotā marķiera vieglākā frakcija sasniedz korķa gēlu).
2. Pārnes proteīnus no poliakrilamīda gēla uz Protean nitrocelulozes membrānas (elektroblots)
- 1) Gēlam ar skalpeli atdala augšējo koncentrējošā gēla zonu. Samitrina Whatman filtrpapīru un sūkļus pārneses buferī.
 - 2) Imunoblota kasetē secīgi ievieto sūkli, Whatman filtrpapīru, gēlu, Protean nitrocelulozes membrānu, Whatman papīru, sūkli (ar aprēķinu, lai gēls atrastos katoda, bet membrāna – anoda pusē)

- 3) Ievieto kaseti elektroforēzes vannā ar pārnese buferi (uz magnētiskā maisītāja) un uz 16h pieslēdz līdzstrāvas barošanas blokam (30V, ~120mA)
 - 4) Krāso uz membrānas pārnestos proteīnus ar 10% Ponso krāsvielu (membrānu iemērc krāsā uz 3 minūtēm, skalo ar ūdeni)
3. Bloķē membrānu un inkubē ar antivielu pret StrepIIITag
- 1) Bloķē membrānu ar 5% piena pulveri 1xTBS + 0,05% Tween 20 buferī 1h uz kratītāja
 - 2) Inkubē membrānu 1h 1x TBS buferī ar 0,5% piena pulvera un 1:5000 atšķaidītu StrepMAB-Classic antivielu
 - 3) 2x noskalo membrānu ar 1x TBS + 0,5% Tween20 buferi; 3x pa 15 minūtēm mazgā membrānu 1x TBS + 0,5% Tween20 buferī uz kratītāja.
 - 4) Inkubē membrānu 1h 1x TBS buferī ar 0,5% piena pulvera un 1:50000 atšķaidītu sekundāro antivielu (HRP konjugēta anti-peles IgG)
 - 5) 2x noskalo membrānu ar 1x TBS + 0,5% Tween20 buferi; 3x pa 15 minūtēm mazgā membrānu 1x TBS + 0,5% Tween20 buferī uz kratītāja.
4. Detektē StrepIIITag iezīmētos peptīdus
- 1) Detekcijai izmanto EC Plus Western Blotting Detection reaģentu komplektu, kas ar HRP dod hemiluminiscentu reakciju pie 410nm. Sajauc 1,5ml ECL Plus šķīdumu A ar 38μl ECL Plus šķīduma B. Maisījumu uznes uz membrānas un izlīdzina pa visu tās virsmu. Lieko notecina.
 - 2) Membrānu ievieto Amersham HypercassetteTM kasetē starp divām polietilēna plēvēm, virsū uzklāj atbilstoša izmēra Amersham HyperfilmTM rentgenfilmu un kaseti noslēdz.
 - 3) Pēc 5 minūtēm eksponēto filmu attīsta, lai noskaidrotu optimālo ekspozīcijas laiku. Kasetē ievieto jaunu filmu, kuras ekspozīcijas laiku izvēlas atkarībā no pirmās filmas ekspozīcijas pakāpes.
 - 4) Attīstīšanu veic 1 minūti iemērcot filmu attīstītājā un tālāk, sekojoši, 1 minūti – fiksāžā. Filmu skalo ar krāna ūdeni

2.2.20. Antigēnu mikročipu izgatavošana un testēšana

1. Antigēnu paraugus (nešķeltu fāgu, šķeltu fāgu, atšķeltu peptīdu) printē uz 16 nitrocelulozes lauciņu FAST slaidiem, izmantojot QArray Mini microarrayer printeri.
2. FAST slaidu ievieto FAST Frame kasetē. Bloķē ar piena pulveri 1h uz kratītāja (50rpm), ienesot katrā lauciņā 90μl 5% piena pulvera koloīda 1xTBS buferī ar 0,05% Tween 20.

3. Preabsorbē serumu paraugus ar *E. coli* – T7 fāga lizātu:
 - 1) Sagatavo sekojošu maisījumu:
 - 180µl 1x TBS ar 0,5% piena pulveri
 - 10µl *E. coli* lizāts
 - 10µl *E. coli* – T7 fāga lizāts
 - 1µl serums
 - 2) Inkubē 1h uz maisītāja
4. Nolej no slaida bloķēšanas maisījumu. Uznes uz nitrocelulozes lauciņiem 90µl preabsorbētu serumu. Lauciņos, kur netiek uzness serums, uznes pa 90µl 1x TBS ar 0,5% piena pulveri. Inkubē 2h uz kratītāja (50rpm).
5. 2x skalo slaidu, atsūcot ar pipeti serumu un ienesot 90µl TBS ar 0,5% Tween 20. Izņem slaidu no kasetes un ievieto Petri platē ar 1x TBS + 0,5% Tween 20. Mazgā 4x pa 15 minūtēm uz kratītāja (50rpm), katreiz nomainot buferi.
6. Pagatavo antivielu atšķaidījumus 1x TBS buferī ar 0,5% piena pulveri:
 - 1) T7 astes šķiedras anti-1/10000
 - 2) StrepMAB Immo – 1/4000
 - 3) StrepMAB Classic – 1/4000
7. Ievieto slaidu kasetē. Ar serumu inkubētajos lauciņos ienes 90µl T7 astes šķiedras antivielas atšķaidījuma. Četros ar serumu neinkubētos lauciņos ienes pa 90µl katras antivielas atšķaidījuma. Inkubē 1h uz kratītāja (50rpm)
8. 2x skalo slaidu, atsūcot ar pipeti antivielas atšķaidījumu un ienesot 90µl TBS ar 0,5% Tween 20. Izņem slaidu no kasetes un ievieto Petri platē ar 1x TBS + 0,5% Tween 20. Mazgā 3x pa 10 minūtēm uz kratītāja (50rpm), katreiz nomainot buferi.
9. Pagatavo sekundāro antivielu atšķaidījumus 1x TBS buferī ar 0,5% piena pulveri:
 - 1) Cy5 iezīmēta kazas anti-cilvēka IgG – 1/1500
 - 2) Cy3 iezīmēta kazas anti-peles IgG – 1/3000
10. Ievieto slaidu kasetē. Ar serumu inkubētajos lauciņos ienes 45µl Cy3 un 45µl Cy5 iezīmētās antivielas atšķaidījuma. Četros ar serumu neinkubētos lauciņos ienes 90µl Cy3 iezīmētās antivielas.
11. 2x skalo slaidu, atsūcot ar pipeti antivielas atšķaidījumu un ienesot 90µl TBS ar 0,5% Tween 20. Izņem slaidu no kasetes un ievieto Petri platē ar 1x TBS + 0,5% Tween 20. Mazgā 3x pa 15 minūtēm uz kratītāja (50rpm), katreiz nomainot buferi. Noskalo ar destilētu ūdeni. Nožāvē centrifugējot.
12. Nolasa čipu ar AQuire skeneri. Analizē ar Genetix QScan datorprogrammu.

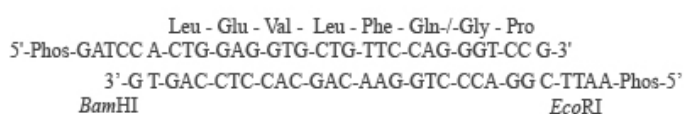
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Mūsu laboratorijā pašlaik tiek veikts pētījums, kura mērķis ir identificēt reprezentatīvu skaitu melanomas un kuņģa vēžu antigēnu, izgatavot antigēnu mikročipu, ar tā palīdzību noteikt autoantivielu repertuāru vēža pacientu un veselu cilvēkā serumā, un novērtēt iespējas izstrādāt uz autoantivielu noteikšanu balstītu neinvazīvu diagnostikas testu. Pētījuma ietvaros antigēnu identificēšanai tiek izmantota uz T7 fāgu displeju balstīta SEREX metode. Šai metodei ir virkne priekšrocību, salīdzinot ar klasisko SEREX. Izmantojot fāgu displeja kDNS bibliotēkas, rekombinantie proteīni tiek ekspresēti kā himērie proteīni ar fāga virsmas proteīnu 10B un eksponēti uz fāgu daļiņu virsmas, kas dod iespēju bagātināt fāgu bibliotēku ar kloniem, kas ekspresē antigēnus pret kuriem serumā ir antivielas procesā, ko sauc par *biopanning*. Tas aizvieto laika un darba-ietilpīgo imunoskrīningu klasiskajā SEREX metodikā, kā rezultātā šī metode ir ievērojami ātrāka, kā arī dod iespēju vienlaikus analizēt vairākas kDNS bibliotēkas. Taču identificēto antigēnu sekvenču analīze parādīja, ka tikai ~10% gadījumu uz fāga virsmas tiek eksponēti dabiskajā fāzē translēti proteīni, bet pārējos gadījumos tiek ekspresēti peptīdi, kas iegūti translējot genomiskās DNS fragmentus, mRNS 5' vai 3' UTR vai kDNS fragmentus alternatīvā nolasīšanas fāzē, tādēļ, lai apietu šo problēmu, mūsu laboratorijā uz Novagen T7Select10-3b bāzes tika izstrādāts jauns T7 fāga displeja vektors, kas, pateicoties 8 aminoskābju garu Strep-II-Tag iezīmi kodējošas sekvences insertam 3' virzienā no kDNS insercijas rajona, sniedz iespēju ne tikai bagātināt bibliotēku ar fāgiem, kas ekspresē dabiskā nolasīšanas fāzē translētus himēros proteīnus, bet arī monitorēt rekombinanto proteīnu īpatsvaru kapsīdā, kas līdz šim radīja problēmas mikročipu testos, jo ļoti variabls rekombinanto proteīnu blīvums rezultējās ar viltus negatīviem signāliem. Tā kā līdzšinējā fāgu mikročipu metode neizslēdz arī viltus pozitīvus signālus gadījumā, ja testējamais serums nav pietiekami labi preabsorbēts ar fāgu lizātu, mūsu laboratorijā šī bakalaura darba ietvaros tika aizsākta jaunas antigēnu mikročipu izgatavošanas pieejas izstrāde, kas ļautu uz čipa printēt no T7 displeja vektora nošķeltus tīrus antigēnus. Šim nolūkam tika izmantots iepriekš konstruētais T7 vektors ar Strep-II-Tag sekvences insertu, kam būtu jādod iespēja atšķeltos antigēnus attīrīt un kvantitēt pateicoties to C gala Strep-II-Tag iezīmes afinitātei pret Strep-Taktīnu un StrepMAB antivielām. Antigēnu atšķelšanai kā piemērotākā tika izvēlēta HRV 3C proteāze, kuras šķelšanas saiti kodējošo sekvenci tika paredzēts ieklonēt 5' virzienā no kDNS insercijas vietas.

3.1. HRV 3C proteāzes šķelšanas saita sekvenci saturošu T7 fāga displeja vektoru konstruēšana

Pirmais no šī darba uzdevumiem bija uzkonstruēt T7 fāga displeja vektoru, kas saturētu HRV 3C proteāzes šķelšanas saita sekvenci un ekspresētu to 10B virsmas proteīna C galā tieši pirms rajona, kurā paredzēts klonēt audzēju asociētos antigēnus. Šāda pieeja ļautu ekspresēt audzēja antigēnus uz T7 fāga virsmas himeru proteīnu veidā un pēc tam tos atšķelt, izmantot HRV 3C proteāzi, sniedzot iespēju gan tieši kvantitēt uz čipa printējamus antigēnus, gan novērst iespējamību, ka nepilnīgi ar T7 fāga lizātu preabsorbēti serumi varētu dot viltus pozitīvus signālus uz čipa.

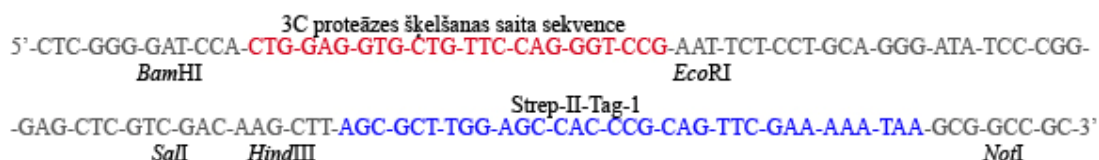
T7-3C vektora konstruēšanai tika izmantots iepriekš mūsu laboratorijā konstruēts T7 vektors ar Strep-II-Tag1 iezīmi, kas nosaukts par T7-SIIT1. Vektors tika šķelts pa *Bam*HI un *Eco*RI restriktāžu saistiem



9. attēls. HRV 3C šķelšanas saitu kodējošs oligonukleotīds

Figure 9. HRV 3C digestion site coding oligonucleotide

un tajā tika ligēts 3C proteāzes šķelšanas saitu kodējošs oligonukleotīds (9. attēls) ar attiecīgo restrikcijas saitu lipīgiem galiem. Vektora ģenētiskais materiāls tika pakots, izmantojot T7Select[®] pakošanas ekstraktu, un uzsēts uz LB agara plātes kopā ar BLT-5615 kultūru.



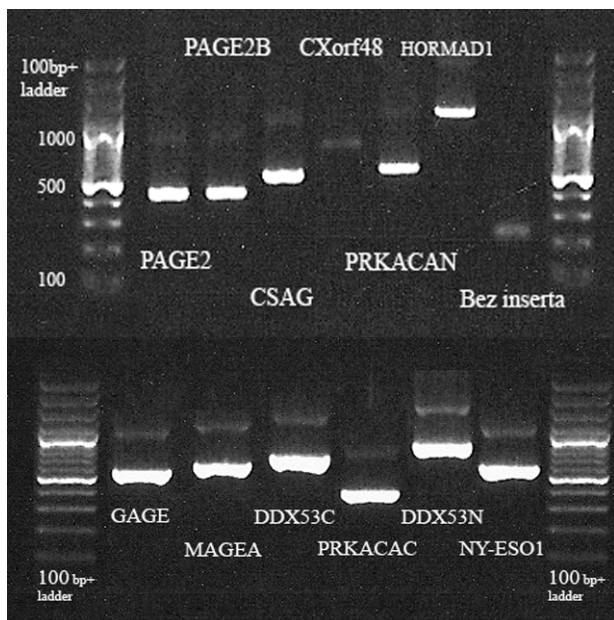
10. attēls. T7-SIIT1 vektora polilinkera rajons ar ieklonētu 3C saitu.

Figure 10. T7-SIIT1 vector's MCS with 3C site

Aptuveni 40 plaki tika izolēti fāgu ekstrakcijas buferī un sekvenēti ar T7 Up2 un T7 Down praimeriem, kā rezultātā atlasīts viens T7 displeja vektors ar pareizi ieligētu 3C proteāzes saita DNS (10. attēls). Izvēlētais fāgs (1. pielikums) tika amplificēts ar šķidrā lizāta metodi 100ml *E. coli* BLT-5615 kultūras un izdalīta 590µg vektora DNS.

3.2. Audzēja asociēto antigēnu klonēšana T7-SIIT1-3C vektorā

Izmantojot sēklinieku kDNS, kā arī individuālus kDNS bibliotēkas klonus ar attiecīgu antigēnu insertiem, PCR reakcijā tika amplificēti 12 fragmenti no 9 dažādiem vēža-sēklinieku antigēniem vai antigēnu saimēm (CSAG, CXorf48, DDX53-Cterm, DDX53-Nterm, GAGE,



11. attēls. Klonēto audzēju antigēnu kDNS fragmentu amplifikācija, izmantojot praimerus, kas atrodas abpus T7-SIIT1-3C vektora polilinkeram.

Figure 11. Amplification of the cloned TAA cDNA inserts, using primers flanking the multiple cloning sites of T7-SIIT1-3C vector.

HORMAD1, MAGEA-Nter, NY-ESO1-Nter, PAGE2, PAGE2B, PRKACA-Cterm, PRKACA-Nterm). Amplificēšanai tika izmantoti praimeri ar *SalI* vai *EcoRI* (F praimeri) un *HindIII* (R praimeri) restrikcijas saitēm. Antigēnu DNS pirms šķelšanas tika paš-līgēta, lai nodrošinātu optimālai restrikcijas endonukleāžu darbībai nepieciešamo pagarinājumu aiz restrikcijas saita. Ar *SalI* vai *EcoRI* un *HindIII* restrikcijas endonukleāzēm šķelta antigēnu DNS tika līgēta atbilstoši šķeltā T7-SIIT1-3C vektorā un pakota ar T7Select[®] pakošanas ekstraktu, rezultātā iegūstot 12 vēža-sēklinieku antigēnu mini-

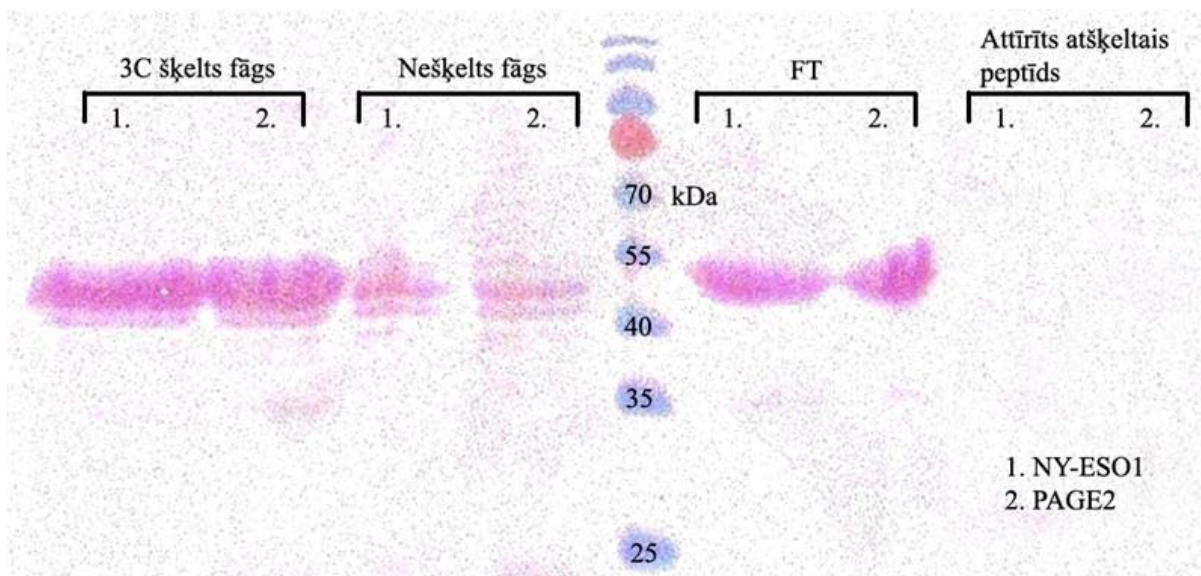
bibliotēkas. Iegūtie fāgi no katras mini-bibliotēkas tika uzsēti uz LB agara platēm kopā ar BLT-5615 kultūru. Aptuveni 32 plaki no katras no 12 mini-bibliotēkas pārstāvošajām platēm tika izolēti fāgu ekstrakcijas buferī un to polilinkera rajoni tika amplificēti, izmantojot T7 Up2 un T7 Down praimerus. Insertus saturošie (pēc elektroforēzes datiem, 11. attēls) paraugi tika sekvenēti un 1-3 kloni ar pareizi ieliģētiem antigēna DNS insertiem no katras mini-bibliotēkas tika atlasīti un amplificēti 300μl BLT-5615 kultūrā. Iegūtie rekombinantie fāgi tālāk tika izmantoti gan šī darba izstrādes ietvaros, gan arī citos mūsu laboratorijā veiktos pētījumos fāgu mikročipu izgatavošanai.

3.3. Audzēju asociēto antigēnu atšķelšana no rekombinanto fāgu daļiņu

virsmas un proteīnu imunoblota analīzes

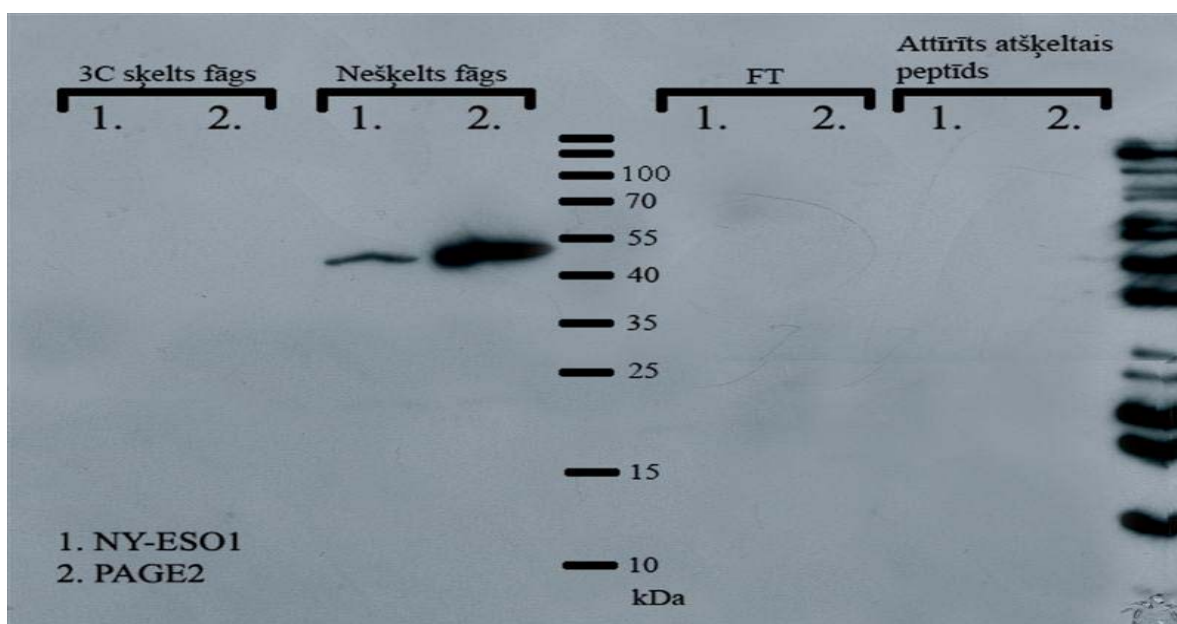
Lai pārlicinātos, ka 3C proteāze spēj atšķelt antigēnu fragmentus no rekombinantā T7 virsmas 10B proteīna, sākumā ar 3C proteāzi tika šķelti divi, attiecīgi NY-ESO1 un PAGE2 antigēnu insertus saturoši T7-SIIT1-3C kloni. Atšķeltie Strep-II-Tag saturošie antigēnu peptīdi tika attīrīti ar Strep-Tactin[®] Spin kolonnām un uznesti uz denaturējoša poliakrilamīda

gēla kopā ar atbilstošajiem nešķeltajiem fāgiem, ar 3C proteāzi šķeltiem fāgiem (neattīrītiem) un caurplūdušo materiālu no Strep-Tactin® Spin kolonnām. Pēc elektroforēzes proteīni no



12. attēls. NY-ESO1 un PAGE2 vēža-sēklinieku antigēnus prezentējošu nešķeltu un ar 3C proteāzi šķeltu T7-SIIT1-3C fāgu, kā arī ar Strep-Tactin Spin kolonnu attīrītu atšķelto peptīdu un kolonnām caurplūdušā materiāla SDS-PAGE aina uz nitrocelulozes membrānas. Proteīni krāsoti ar Ponso krāsvielu.

Figure 12. SDS-PAGE of phages expressing NY-ESO1 and PAGE2: undigested, 3C protease digested and Strep-Tactin Spin column purified TAA's and flowthrough. Proteins are stained with Ponso stain.



13. attēls. NY-ESO1 un PAGE2 vēža-sēklinieku antigēnus prezentējošu nešķeltu un ar 3C proteāzi šķeltu T7-SIIT1-3C vektoru, kā arī ar Strep-Tactin Spin kolonnu attīrītu atšķelto peptīdu un kolonnām caurplūdušā materiāla imunoblota aina. Vienīgi nešķelti vektori tiek atpazīti ar StrepMAB-Classic antivielu pret Strep-Tag iezīmi.

Figure 13. Western blotting of NY-ESO1 and PAGE2 TAA's presenting undigested and 3C protease digested T7-SIIT1-3C vectors as well as Strep-Tactin Spin column purified TAA's and flowthrough. Only undigested vectors are recognized with StrepMAB-Classic antibody.

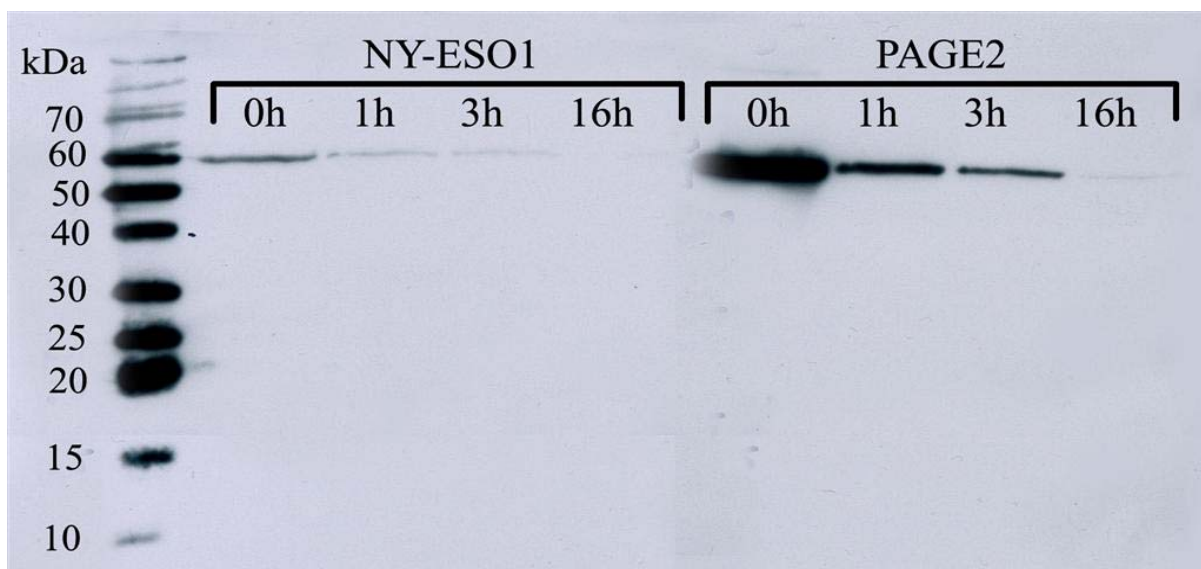
PAA gēla tika pārnesti uz nitrocelulozes membrānas un krāsoti ar Ponso krāsvielu, lai novērtētu uznesto proteīnu aptuveno daudzumu (12. attēls). StrepIIITag iezīmi saturošie

proteīni tika detektēti ar StrepMAB-Classic antivielu un HRP konjugētu sekundāro antivielu, izmantojot un EC Plus Western Blotting detektēšanas reaģentu komplektu un rentgenfilmu.

Imunoblots ar StrepMAB-Classic antivielu parādīja, ka pēc 16h apstrādes ar 3C proteāzi pie 8°C no fāga virsmas praktiski pilnībā tiek nošķelti antigēnu fragmenti, taču ne ar Ponsu krāsvielu, ne ar StrepMAB-Classic antivielu nošķeltie ~11kDa fragmenti netika detektēti (13. attēls), uz kā pamata tika izvirzītas divas alternatīvas hipotēzes:

- A. Nošķeltie peptīdi tiek degradēti. Degradāciju, iespējams, izraisa proteāžu piemaisījumi no *E. coli* lizāta, vai arī peptīdu atšķelšanai izmantotā 3C proteāze, visticamāk, dēļ kontaminācijām vai nedabiskiem reakcijas apstākļiem.
- B. Nošķeltie peptīdi netiek degradēti. Uz nitrocelulozes membrānas tie nav redzami, jo, dēļ nelielās 11kDa molekulmasas, iespējams, nesaistās pie šajā eksperimentā lietotās membrānas (45µm poru diametrs) vai neskaidru iemeslu dēļ StrepMAB-Classic antivielu nespēj ar tiem saistīties.

Pieņemot, ka atšķeltie peptīdi tiek degradēti, tika veikta atkārtota NY-ESO1 un PAGE2 antigēnu peptīdu atšķelšana, reakciju pārtraucot pēc 0, 1, 3 un 16 stundām (iesaldējot pa 50µl



14. attēls. Imunoblota aina ar StrepMAB-Classic antivielu, kas parāda ar 3C proteāzi no T7-SIIT1-3C vektoru virsmas nenošķelto antigēnu īpatsvara atkarību no reakcijas laika. Nošķeltie antigēni ar StrepMAB-Classic antivielu netiek atpazīti.

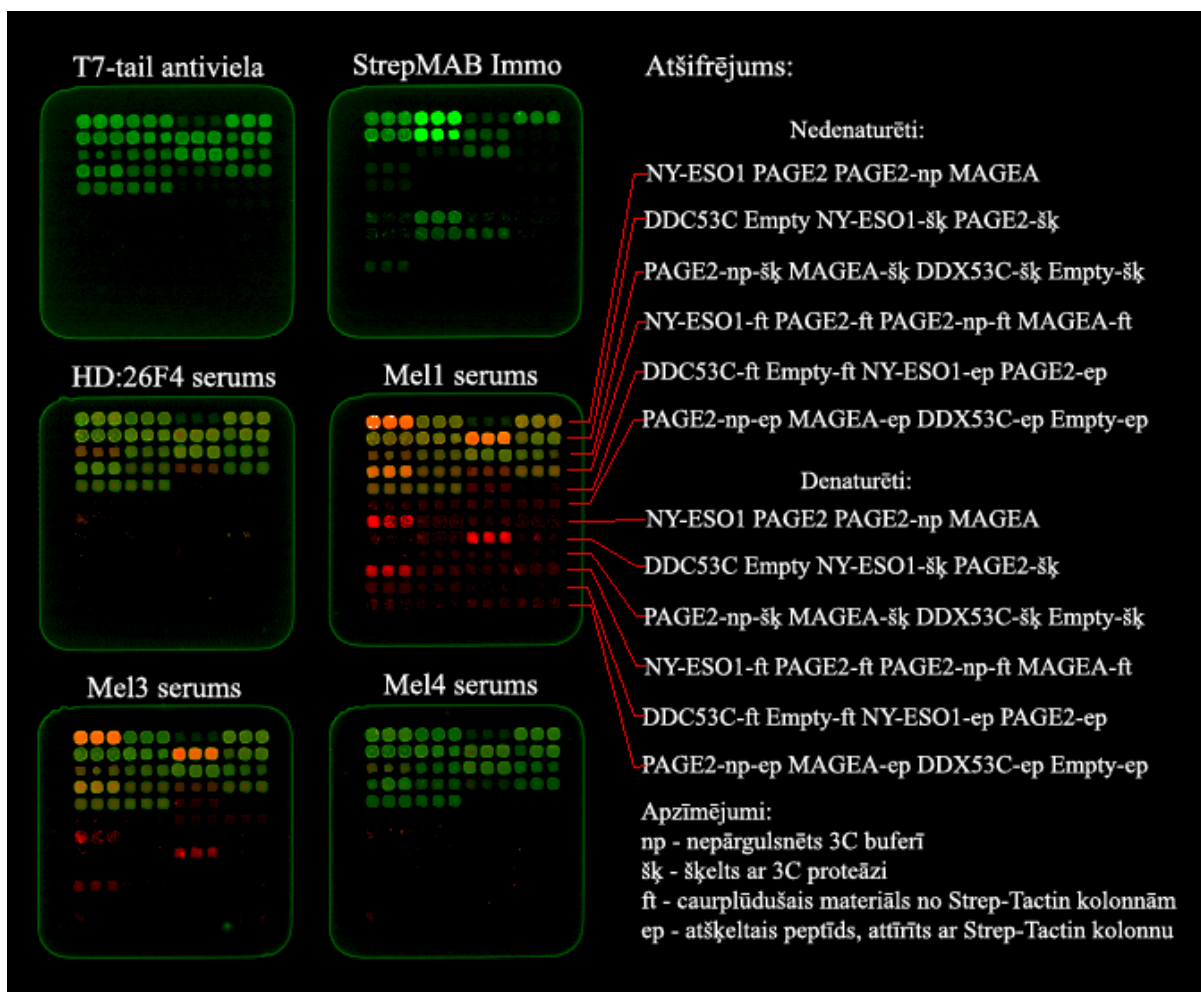
Figure 14. Western Blotting showing the time-course of 3C protease digestion of NY-ESO1 and PAGE2 expressing T7-SIIT1-3C phages. Strep-II-Tag labeled proteins digested by 3C protease are not recognized by StrepMAB-Classic antibody.

no kopējā 200µl tilpuma pie -20°C), lai noteiktu, kāda ietekme uz iespējamo atšķelto peptīdu degradāciju ir reakcijas laikam. Imunoblota rezultāti (14. attēls) parādīja, ka pēc 1h no fāgu virsmas tiek atšķelti ~60% antigēnu peptīdu, pēc 3h - ~80%, pēc 16h - ~95%, taču nevienā gadījumā atšķeltie peptīdi nav detektējami ar StrepMAB-Classic antivielu. Tādi paši rezultāti

tika iegūti, šķeļot termiski denaturētu fāgu (5 minūtes pie 100°C), līdz ar to tika atmesta iespējamība, ka atšķeltos peptīdus degradē kāda proteāze no *E. coli* lizāta.

3.4. Antigēnu mikročipu izgatavošana un testēšana

Uz 16 NC lauciņu FAST slaidiem tika printēti četri vēža-sēklinieku antigēni – NY-ESO1, PAGE2, MAGEA un DDX53-Cterm un kontroles (insertu nesaturošs) fāgs. Lai atbildētu uz jautājumu – kas notiek ar 3C proteāzes atšķeltajiem antigēnu peptīdiem, printēšanai tika ņemti nešķelti antigēnus prezentējoši fāgi, ar 3C proteāzi šķelti fāgi, ar Strep-



15. attēls. T7 fāgu displeja un ar 3C proteāzi atšķeltu četru audzēja asociēto antigēnu mikročips, kas tika testēts ar četriem serumiem (detektēts ar Cy5 iezīmētu sekundāro antivielu), StrepMAB-Immo un T7 astes šķiedras antivielu (abas detektētas ar Cy3 iezīmētu sekundāro antivielu)

Figure 15. Both T7 phage-displayed and 3C cleaved antigen microarray, tested with four sera (detected with Cy5 labeled secondary antibody), StrepMAB-Immo and T7 tail fiber antibody (both detected with Cy3 labeled secondary antibody).

Tactin kolonnām attīrīti antigēnu peptīdi, kā arī Strep-Tactin kolonnām caurplūdušais materiāls. Mikročipi tika testēti ar četriem serumiem (Mel1, Mel3 – NY-ESO1⁺ melanomas pacientu, Mel4 – melanomas pacienta, HD:2674 – vesela cilvēka), T7 astes šķiedru antivielu, StrepMAB-Immo antivielu pret StrepII Tag iezīmi, kā arī Cy5 un Cy3 konjugētām

sekundārajām antivielām un nolasīti ar AQuire skeneri, kā arī vizualizēti ar QScan datorprogrammas palīdzību (15. attēls)

Katrā punktā tika noteiktas cianīnu Cy5 (konjugēts ar sekundāro antivielu pret cilvēka IgG, atpazīst seruma IgG) un Cy3 (konjugēts ar sekundāro antivielu pret peles IgG, atpazīst T7 astes šķiedru un StrepMAB-Immo antivielas) fluorescences intensitātes un analizētas sekojošā veidā:

1. Katram antigēnam katrā laukumā tika aprēķināta vidējā Cy5 un Cy3 signāla intensitāte starp 3 replikātiem;
2. Katram punktam noteikta StrepMAB Immo/T7 astes antivielas signālu attiecība (vidējā no trim replikātiem);
3. Katram punktam, kurā uznešts fāgs (nešķelts vai šķelts ar 3C proteāzi) aprēķināta Cy5 (seruma IgG)/Cy3 (antiviela pret T7 asti) signālu attiecība;

Iegūtie rezultāti (2. pielikums) parādīja, ka:

1. Visos punktos, kuros uznešti rekombinantie fāgi (nešķelti un šķelti), ar T7 astes antivielu detektējama fāga klātbūtne salīdzināmā daudzumā.
2. Visos punktos, kuros uznešts rekombinantais fāgs, ar StrepMAB-Immo antivielu detektējams SterpII iezīmēts rekombinantais proteīns. Šī signāla intensitāte attiecībā pret fāgu daudzumu (T7 astes antiViela) variē robežās no 0.64 (MAGEA ekspresējošam fāgam) līdz 4.21 (tukšam T7-SIIT1-3C fāgam), kas parāda, ka rekombinanto proteīnu kopiju skaits uz dažādu fāgu virsmas ir variabls. StrepMAB-Immo signāla intensitāte būtiski samazinās punktos, kuros uznešts šķelts fāgs – MAGEA, PAGE2 un tukšam fāgam gandrīz līdz fona līmenim, DDX53 un NY-ESO1 ekspresējošiem fāgiem ~3.1 reizi, kas liecina par to, ka apstrāde ar 3C proteāzi samazina antivielai pieejamo Sterp II Tag iezīmes daudzumu. StrepMAB-Immo signāls netika detektēts nevienā no punktiem, kuros uznešts ar Sterp-Tactin kolonnām attīrītais atšķeltais rekombinantais proteīns; zemas intensitātes signāli tika detektēti 3 gadījumos, kur uznešts caurplūdušais materiāls no Sterp-Tactin kolonnām, taču to visticamāk, dod neliels nešķeltu fāgu piemaisījums šajos preparātos.
3. Autoantivielu klātbūtne pret vienu no audzēju antigēniem – NY-ESO1 tika detektēta divos melanomas pacientu serumos (Mel 1 un Mel 3). NY-ESO1 prezentējošiem kloniem, kas šķelti ar 3C proteāzi (šķelšanas efektivitāte >95%), reaktivitāte ar NY-ESO1⁺ serumiem samazinājās vidēji tikai 1,2 reizes, kas pārlicinoši pierāda, ka 3C proteāzes atšķeltie antigēnu peptīdi netiek degradēti.

4. Fāgu termiska denaturācija (5 min karsējot pie 98°C) pirms uznešanas uz čipa pilnībā izjauc epitopu, kuru pazīst T7 astes antivielā, kā arī neuzlabo seruma IgG vai StrepMAB-Immo saistīšanos ar rekombinantajiem proteīniem

Tā kā atšķeltie peptīdi nav detektējami ar StrepMAB antivielām ne imunoblotā, ne uz čipa un ar 3C šķelto fāgu reaktivitāte pret StrepMAB-Immo antivielām uz čipa būtiski samazinās vidēji 1510 reizes, tika secināts, ka 3C proteāze modificē vai degradē atšķeltā peptīda C gala Strep-II-Tag iezīmi, kā rezultātā atšķeltie peptīdi ne tikai nav detektējami ar antivielām pret Strep-Tag, bet arī tos nav iespējams attīrīt ar Strep-Tactin Spin kolonnu, kā tas arī vērojams mikročipu testos.

Turpmākajos pētījumos, veicot imunoblotu ar NY-ESO1 antivielām, būtu iespējams pilnībā pārlicināties, ka atšķeltajiem peptīdiem tiek degradēts vai modificēts C gals ar Strep-II-Tag iezīmi, neietekmējot pašu antigēnu. Kā risinājumu, lai novērstu Strep-II-Tag degradāciju vai modificēšanu, varētu izmantot konkurējošu antigēnu prezentējošo fāgu Strep-II-Tag iezīmes piesaistīšanu superparamagnētiskām ar Strep-Taktīnu pārklātām mikrolodītēm, kas, visticamāk, neļautu 3C proteāzei degradēt Strep-II-Tag iezīmi, taču, cerams, netraucētu šķelšanu 3C saitā. Tā, kā 3C proteāze antigēnu no himērajiem 10B proteīniem atšķēļ ļoti efektīvi, šāda pieeja ļautu uz mikročipiem printēt no Strep-Taktīna lodītēm eluētus antigēnus, pat neveicot to tālāku attīrīšanu no nešķeltajiem fāgiem ar Strep-Taktīna Spin kolonnām. Kā rezerves iespējamus risinājumus vēl varētu izmantot reakcijas apstākļu optimizāciju, ja C gala modificēšana saistīta ar nedabiskiem reakcijas apstākļiem vai cita ražotāja 3C proteāzi, ja C gala modificēšana saistīta ar proteāzes kontaminācijām

4. SECINĀJUMI

1. Tika uzkonstruēts T7-SIIT1-3C fāgu displeja vektors ar HRV 3C proteāzes šķelšanas saitu kodējošas sekvences insertu.
2. Klonējot iegūtajā vektorā 12 zināmu audzēju antigēnu kDNS fragmentus, iegūts antigēnu ekspresējošu fāgu panelis, kas tika izmantots šajā darbā rekombinanto proteīnu šķelšanas metodikas izstrādāšanai, un citā projektā – fāgu-antigēnu mikročipu izgatavošanai, kas pašlaik tiek izmantoti autoantivielu profilēšanai
3. Antigēnu peptīdi tika atšķelti no T7-SIIT1-3C displeja vektora 10B apvalka proteīna, izmantojot HRV 3C proteāzi; lai gan šķelšanas efektivitāte bija augsta (>95%), atšķeltie peptīdi nebija detektējami ar StrepMAB antivielām gan proteīnu imunoblotā, gan uz čipa.
4. Tika izveidots un testēts mikročips ar četriem audzēju antigēniem un kontroles fāgu
5. Testējot čipu ar NY-ESO1⁺ pacientu serumiem, tika pierādīts, ka 3C proteāze degradē vai modificē atšķelto peptīdu C gala StrepII Tag iezīmi, kā rezultātā atšķeltie peptīdi nevar tikt attīrīti ar Strep-Taktīna kolonnu un detektēti ar antivielām pret StrepII Tag

5. PATEICĪBAS

Darbs tika izstrādāts Valsts pētījumu programmas "Jaunas zāles un biokorekcijas līdzekļi: konstruēšana, transportformas un darbības mehānisms" projekta Nr. 9 "Ļaundabīgo audzēju seroloģiska diagnostikas testa izstrādāšana" ietvaros.

Izsaku pateicību bakalaura darba vadītājai Dr. biol. Aijai Linē par ieguldījumu šī darba tapšanā.

6. LITERATŪRAS SARAKSTS

Monogrāfijas

1. Cooper G. M. 1993. The cancer book: a guide to understanding the causes, prevention, and treatment of cancer. Boston: Jones & Bartlett Publishers, 236 pp.
2. Ewing J. 1928. A treatise on tumors. In: Neoplastic diseases. London: WB Saunders Co, 77-89 pp.

Raksti žurnālos

1. Allan A. L., Vantigham S. A., Tuck A. B., Chambers A. F. 2007. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis.*, 26: 87-98.
2. Antonio M. 2005. Phage display technology: applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28(1):1-9.
3. Bancroft G. J., Schreiber R. D., Unanue E. R. 1991. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.*, 124: 5-24.
4. Barnhart B. C., Simon M. C. 2007. Metastasis and stem cell pathways. *Cancer Metastasis Rev.*, 26: 261-271.
5. Benlagha K., Bendelac A. 2000. CD1d restricted mouse V α 14 T cells: lymphocytes of innate immunity. *Semin. Immunol.*, 12: 537-542.
6. Bjerkvig R., Tysnes B. B., Aboody K. S., Najbauer J., Terzis A. J. 2005. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*, 5: 899-904.
7. Bryan T.M., Englezou A., Gupta J., Bacchetti S., Reddel R.R. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, 14(17): 4240–4248.
8. Chen W., Ede N. J., Jackson D. C., McClukey J., Purcell A. W. 1996. CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement. Implications for immunity and vaccine design. *J Immunol*, 157: 1000-1005.

9. Chen T., Scanln J., Sahin U., Türeci Ö., Gure A. O., Tsang S., Williamson S., Stockert E., Pfreundschuh M., Old L. J. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1914-1918.
10. Clarke M. F., Dick J. E., Dirks P. B., Eaves C. J., Jamieson C. H., Jones D. L., Visvader J., Weissman I. L., Wahi G. M. 2006. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.*, 66: 9339-9344.
11. Coulie P. G., Brichard V., Van Pel A., Wölfel T., Schneider J., Traversari C., De Plaen E., Lurquin C., Raunald C. J., Boon T. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, 180: 36-42.
12. De Plaen E., Arden K., Traversari C., Gaforio J. J., Szikora J. P., De Smet C., Brasseur F., van der Bruggen P., Lethe B., Lurquin C. 1994. Structure, chromosomal localisation, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40:360-369.
13. Duelli D., Lazebnik Y. 2007. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7: 968-976.
14. Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. 2004^a. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunitu*, 21: 137-148.
15. Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D. 2004^b. The three es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22: 329-360.
16. Eppenberger U., Kueng W., Schlaeppli J. M., Roesel J. L., Benz C., Mueller H., Matter A., Zuber M., Luescher K., Litschgi M., Schmitt M., Foekens J. A., Eppenberger-Castori S. 1998. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 16: 3129-3136.
17. Fedi P., Tronick S. R., Aaronson S. A. 1997. Growth factors in cancer medicine. *Williams & Wilkins*, 41-64.
18. Fidler I. J. 1970. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl Cancer Inst*, 45: 773-782.

19. Fidler I. J. 2001. Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. *Surg Oncol Clin N Am*, 10: 257-269.
20. Hanahan D., Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
21. Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G., Rickinson A. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(18): 8479–8483.
22. Hodge-Dufour J., Noble P. W., Horton M. R., Bao C., Wysoka M. 1997. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion - dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunol*, 159: 2492-2500.
23. Jäger E., Gnjjatic S., Nagata Y., Stockert E., Jäger D., Karbach J., Neumann A., Rieckenberg J., Chen Y., Ritter G., Hoffman E., Arand M., Old L. J., Knuth A. 2000. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *PNAS*, 97(22):12198-12203.
24. Jaiswal S., Traver D., Miyamoto T. 2003. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 10002-10007.
25. Kalniņa Z., Siliņa K., Meistere I., Zayakin P., Rivosh A., Ābols A., Leja M., Minenkova O., Schadendorf D., Linē A. 2008. Evaluation of T7 and lambda phage display systems for survey of autoantibody profiles in cancer patients. *Journal of Immunological Methods*, 334:37-50.
26. Kang Y., Massague J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118: 277-279.
27. Kucia M., Ratajczak M. Z. 2006. Stem cells as two edged sword – from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol*, 57: 5-16.
28. Kwon I. K., Schoenlein P. V., Delk J., Liu K., Thangaraju M., Dulin N. O., Ganapathy V., Berger F. G., Browning D. D. 2008. Expression of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in metastatic colon carcinoma cells blocks tumor angiogenesis. *Cancer*, 112(7): 1462-1470.

29. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Careras-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuris M. A., Dick J. E. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367: 645-648.
30. Li F., Tiede B., Massagu J., Kang Y. 2007. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Research*, 17: 3-14.
31. Liotta L. A., Espina V., Mehta A. I., Calvert V., Rosenblatt K., Geho D., Munson P. J., Young L., Wulfkühle J., Petricoin E. F. 2003. Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer cell* 3(4):317-25.
32. Loeb L. A. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51: 3075-3079.
33. Loeb L. A., Loeb K. R., Anderson J. P. 2003. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 776-781.
34. Medema R. H., Bos J. L. 1993. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*, 4: 615-661.
35. Münger K., Scheffner M., Huibregtse J. M., Howley P. M. 1992. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv*, 12: 197-217.
36. Murgia C., Pritchard J. K., Kim S. Y., Fassati A., Weiss R. A. 2006. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, 126(3): 477-487.
37. O'Brien C. A., Pollet A., Gallinger S., Dick J. E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445: 106-110.
38. Ono M., Yasunaga T., Miyata T., Ushikubo H. 1986. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol*, 60: 589-598.
39. Pantel K., Brakenhoff R. H. 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4: 448-456
40. Perkel J. M. 2002. Telomeres as the key to cancer. *The Scientist*, 16: 1111, 38-40.

41. Polster B. M., Pevsner J., Hardwick J. M. 2004. Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644: 211-227.
42. Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Welssman I. L. 2001. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 414: 105-111.
43. Rizvi A. Z., Swain J. R., Davies P. S. 2006. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 6321-6325.
44. Rosenberg A., Griffin K., Studier F. W., McCormick M., Berg J. Novy R., Mierendorf R. 1996. T7Select® Phage Display System: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Newsletter of Novagen, Inc.*, 6:1-6.
45. Sagar J., Chaib B., Sales K., Winslet M., Seifalian A. 2007. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review - *Cancer Cell International*, 7: 9.
46. Sahin U., Türeci Ö., Pfreundschuh M. 1997. Serological identification of human tumor antigens. *Current Opinion in Immunology*, 9(5): 709-716.
47. Sahin U., Türeci Ö., Schmitt H., Cochlovius B., Johannes T., Schmits R., Stenner F., Lup G., Schobert I., Pfreundschuh M. 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 11810-11813.
48. Schmitt F. C., Soares R. 1999. TGF-[alpha] and Angiogenesis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 23(3): 358-359.
49. Shay J. W., Zou Y., Hiyama E., Wright W. E. 2001. Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, 7: 677-685.
50. Skipper J. C. A., Hendrickson R. C., Gulden P. H., Brichard V., Van Pel A., Chen Y., Shabanowitz J., Wölfel T., Slingluf C. L. J. R., Boon T. 1996. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med*, 183: 527-534.
51. Smith G. P., Petrenko V. A. 1997. Phage display. *Chemical Reviews*, 97:391-410.

52. Takaoka A., Hayakawa S., Yanai H., Stoiber D., Negishi H., Kikuchi H., Sasaki S., Imai K., Shibue T., Honda K., Taniguchi T. 2003. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*, 424(6948): 516-523.
53. Teodoro J. G., Branton P. E. 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol*. 71(3): 1739–1746.
54. Thiery J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer*, 2: 442-454.
55. Türeci O., Sahin U., Pfreundschuh M. 1997. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Molecular Medicine Today*, 3(8):342-349.
56. van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., van der Eynde B., Knuth A., Boon T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647.
57. Viola A., Lanzavecchia A. 1996. T Cell Activation Determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, 273: 104-106.
58. Virchow R. 1855. Editorial. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, 3: 23.
59. Weinberg R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330.
60. Willats W. G. T. 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, 50(6):837-854.
61. Wrenshall L. E., Stevens R. B., Cerra F. B., Platt J. L. 1999. Modulation of macrophage B and cell function by glycosaminoglycans. *J. Leukoc. Biol.*, 66: 391-400.
62. Yang F., Chen I. H., Xiong Z., Yan Y., Wang H., Yang X. F. 2006. Model of stimulation-responsive splicing and strategies in identification of immunogenic isoforms of tumor antigens and autoantigens. *Clin Immunol*, 121(2): 121-33.
63. Yang F., Yang X. F. 2005. New concepts in tumor antigens: their significance in future immunotherapies for tumors. *Cell Mol Immunol*, 2(5):331-41.

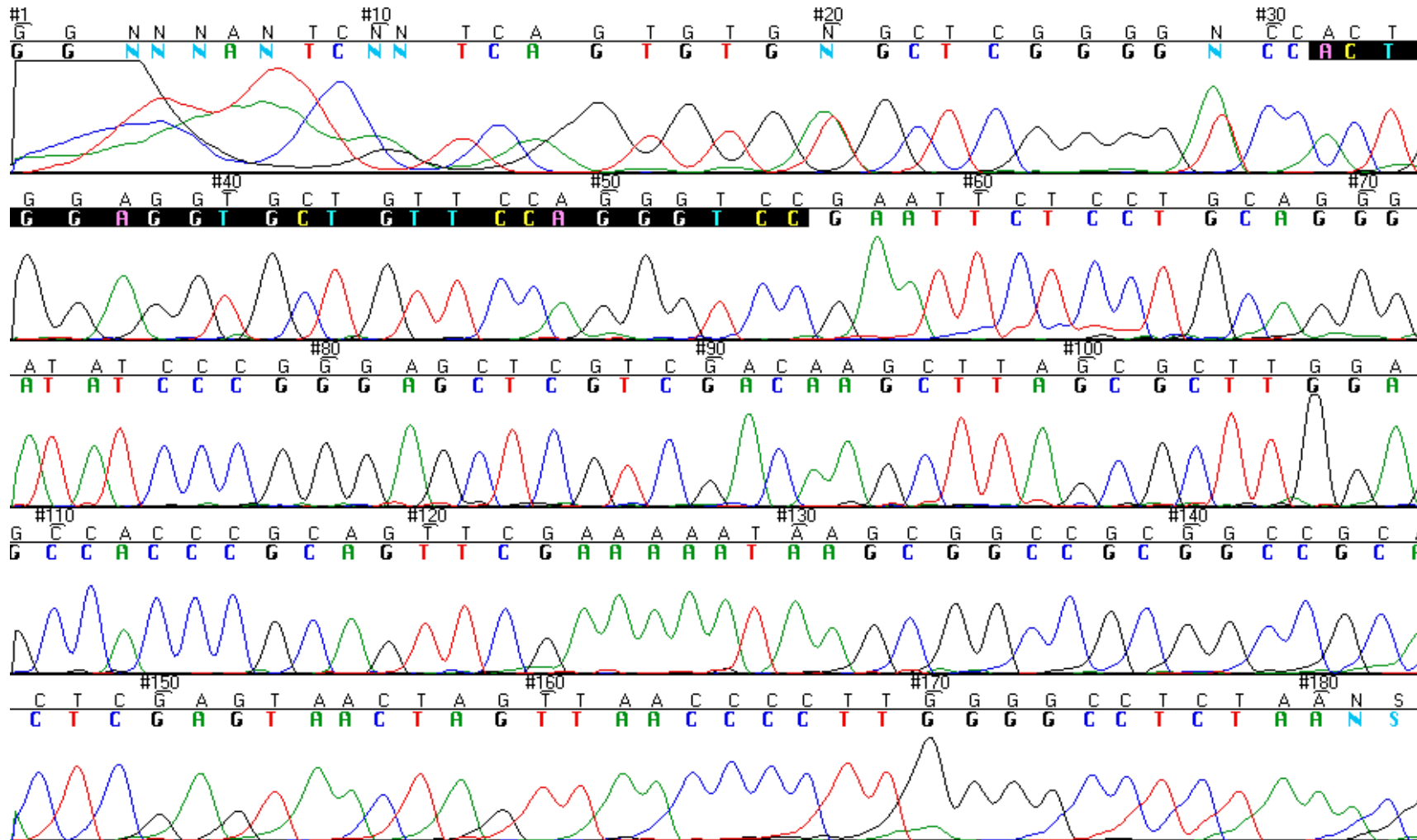
64. Yang L., Mashima T., Sato S., Mochizuki M., Sakamoto H., Yamori T., Oh-Hara T., Tsuruo T. 2003. Predominant Suppression of Apoptosome by Inhibitor of Apoptosis Protein in Non-Small Cell Lung Cancer H460 Cells. *Cancer Research*, 63: 831-837.
65. Yuichi O., Kohei T., Masahiro Y., Hiromi T., Toshitada Y. 2002. Immunogenic Gene Products in Cancer Patients Identified by SEREX. *Biotherapy*, 16(5): 433-440.

Interneta vietnes

1. American cancer society 2005. Cancer explained.
<http://www.nasmedical.com/page?id=1423>
2. Chen Y. T., Scanlan M. J., Obata Y., Old L. J. 2004. Identification of Human Tumor Antigens by Serological Expression Cloning: An Online Review on SEREX.
<http://www.cancerimmunity.org/SEREX/index.htm>
3. Ludwig Institute For Cancer Research 2007. Cancer Antigen Identification.
http://www.licr.org/D_programs/d4a1.php

1. Pielikums. T7-SIIT1 vektora polilinkera rajons ar ieklonētu 3C proteāzes šķelšanas saita sekvenci

Appendix 1. T7-SIIT1 vector's MCS with inserted sequence of HRV 3C protease digestion site



2. Pielikums. Seroreaktivitāte pret fāgu displeja un ar 3C proteāzi nošķeltiem audzēja asociētajiem antigēniem uz mikročipa

Appendix 2. Seroreactivity against both T7 phage-displayed and 3C cleaved TAAs on microarray

Clone	Strep Immo	T7 tail	Strep/T7	HD: 26F4		Mel1		Mel3		Mel4	
				Cy5	Cy5/T7	Cy5	Cy5/T7	Cy5	Cy5/T7	Cy5	Cy5/T7
DOX53C	3330.00	3212.00	1.037	2168	0.94	2714	1.311	1528.7	0.717	699	0.375
DOX53C ep	0.00	0		0	NA	366.67	NA	819.0	NA	0	NA
DOX53C ft	82.50	1885.67	0.044	1644	1.3	2854.33	2.44	2286.3	2.091	119.666	0.345
DOX53C sk	1312.83	3920.00	0.335	3223.67	1.133	2175.67	0.828	1883.7	0.814	1186	0.58
Empty	18857.50	4479.67	4.210	2825.00	0.938	2883.33	1.049	1450.0	0.545	831	0.34
Empty ep	0.00	16.00	0.000	0.00	NA	410.67	NA	870.7	NA	0	NA
Empty ft	19.83	1848.33	0.011	1438.33	1.056	1767.33	1.391	1467.3	1.254	0	0.158
Empty sk	1.83	2380.00	0.001	1278.33	0.735	957.33	0.745	983.0	0.771	123	0.168
MAGEA	3370.50	5248.00	0.642	3650.33	1.272	4498.67	1.49	2478.3	0.864	1143.666	0.47
MAGEA ep	0.00	0.00		0.00	NA	345.33	NA	412.7	NA	0	NA
MAGEA ft	0.00	2023.00	0.000	962.33	0.835	2806.33	2.189	1753.3	1.913	0	0.179
MAGEA sk	134.83	1891.33	0.071	1897.67	1.108	1411.67	1.081	1442.7	0.994	294	0.2830
NYESO1	4433.33	5174.00	0.857	3726.67	1.058	41114.33	14.727	33433.7	11.101	1376.333	0.479
NYESO1 ep	0.00	6.67	0.000	0.00	NA	1016.00	NA	1001.0	NA	0	NA
NYESO1 ft	183.50	3155.33	0.058	2405.67	0.868	12529.67	5.262	9516.0	3.607	649.666	0.348
NYESO1 sk	1152.33	4197.00	0.275	4229.00	1.595	36850.33	12.865	25146.7	9.442	1551	0.77
PAGE2	13830.00	3780.33	3.658	1765.00	0.821	2044.00	0.868	1073.0	0.541	439.333	0.247
PAGE2 ep	0.00	0.00		0.00	NA	33.33	NA	0.0	NA	0	NA
PAGE2 ft	0.00	1350.33	0.000	1449.67	1.588	2280.00	2.667	1846.7	2.24	317.666	0.551
PAGE2 sk	6.33	3581.67	0.002	2819.00	1.07	2227.00	0.981	1855.7	0.997	789	0.443